

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I Klinikum Großhadern,
der
Ludwig-Maximilians-Universität, München
Direktor: Prof. Dr. med. S. Massberg

Ischämische- und pharmazeutische Postkonditionierung mittels
Ciclosporin A zur Reduktion von Reperfusionsschäden im akuten
Myokardinfarkt am präklinischen Schweinemodell

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Carlo Felix Maria Jung
aus Mannheim

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Peter Boekstegers

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Harald Kramer
Prof. Dr. med. Bernhard Kuch

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Corinna Lebherz

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 06.02.2014

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	7
1.1. Koronare Herzerkrankung	7
1.2. Reperfusionsschaden: Mechanismus	8
1.2.1. ROS	10
1.2.2. Calcium-Überladung	11
1.2.3. pH-Änderungen	11
1.2.4. Änderungen der Osmolarität	12
1.2.5. Neutrophile Granulozyten	12
1.2.6. Öffnung der mPTP	13
1.3. Kardioprotektion durch Prä- und Postconditioning	15
1.3.1. Ischämische Präkonditionierung	16
1.3.2. Ischämische Postkonditionierung	18
1.4. Cicosporin A als Inhibitor der mPTP	21
1.5. Aktuelle klinische Studien IPoc und CsA	22
1.6. Fragestellungen	23
2. Methoden	26
2.1. Versuchsbeschreibung/Regularien	26
2.2. Versuchstag 1	26
2.2.1. Vorbereitung, Narkose und Überwachung der Vitalparameter	26
2.2.2. Antikoagulation und Antibiose	27
2.2.3. Infusionen	27
2.2.4. Gefäßzugänge	27
2.2.5. Angiographie und Druckmessung	28
2.2.6. Infarktinduktion und Therapie	30

2.2.6.1. Kontrolltiere	31
2.2.6.2. Ischämisches Postconditioning	32
2.2.6.3. Ciclosporin A systemische Applikation	32
2.2.6.4. Ciclosporin A Retroinfusion	33
2.2.7. Selektive Absaugung und Retroinfusion, Funktionsprinzip der SSR	33
2.2.8. Retrograde Applikation von Ciclosporin A	37
2.2.9. Blutproben	38
2.3. Versuchstag 2	39
2.3.1. Wiederholung der Schritte 2.2.1. - 2.2.6.	39
2.3.2. Sternotomie	39
2.3.3. Sonomikrometrie: Regionale Myokardfunktion	40
2.3.4. Färbung, Explantation, Gewebeasservation, Infarktgrößenauswertung	43
2.4. Myeloperoxidase-Messung zum Nachweis von Neutrophilen Granulozyten	46
2.5. RISK-pathway - Western Blots	47
2.6. Liquid Chromatography Tandem Massenspektrometrie zum Nachweis von intramyokardialen CsA-Konzentrationen	48
2.7. Kammerflimmern, Intervention	49
2.8. Ausschlusskriterien	50
2.9. Statistische Datenanalyse	50
3. Material	51
4. Ergebnisse	56
4.1. Infarktgrößen	57

4.2. Myeloperoxidase	59
4.3. Globale Myokardfunktion nach Ischämie und Reperfusion:	
LVEDP, Ejektionsfraktion, dp/dt.	61
4.3.1. Ejektionsfraktion	61
4.3.2. LVEDP	62
4.3.3. dp/dt max/min	63
4.4. Regionale Myokardfunktion: Sonomikrometrie - Segmentverkürzung	66
4.5. Ciclosporinbestimmungen Blut	69
4.6. intramyokardiale Ciclosporin-Bestimmung LC-Tandem MS	70
4.7. Western Blot RISK-Pathway	71
4.8. Kardiospezifische sowie allgemeine Ischämiemarkers: CK, Troponin, LDH, GOT, GPT	75
5. Diskussion	79
5.1. Allgemeines	79
5.2. IPoc	81
5.3. Intervention mit CsA	83
5.3.1. Systemische Applikation von CsA	83
5.3.2. Retroinfusion von CsA	84
5.3.3. Überlegungen zur CsA-Therapie	85
5.4. Proteine des RISK - Signalwegs	86
5.5. Anmerkungen zum präklinischen tierexperimentellen Modell am Schwein	87
5.6. Übertragbarkeit der Erkenntnisse auf den menschlichen Organismus	88
5.7. Interaktionen angewandter Pharmazeutika	89
6. Zusammenfassung	91
7. Abkürzungsverzeichnis	93

8. Literaturverzeichnis	96
9. Danksagung	112
10. Lebenslauf	113

1. Einleitung

1.1. Koronare Herzkrankheit

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind eine der Haupttodesursachen in westlichen Industrienationen. Mit der höchsten Morbidität und Mortalität weist dabei die Koronare Herzkrankheit auf. Im Zuge dieser Erkrankung können mehrere klinische Bilder entstehen, wie stille Ischämie, stabile/instabile Angina Pectoris, akuter Myokardinfarkt (AMI), Herzinsuffizienz und plötzlicher Herztod ^[1]. Unter dem Akuten - Koronar - Syndrom (ACS), als Teil der KHK versteht man zusammengefasst die instabile Angina Pectoris, den „non ST-elevation myocardial infarct“ (NSTEMI) und „ST-elevation myocardial infarct“ (STEMI).

Die Inzidenz des Herzinfarkts beträgt in Deutschland ca. 300/100.000/Jahr^[2]. Zentrale Pathophysiologie aller genannten Erkrankungen ist eine komplette oder teilweise Stenosierung von Herzkranzarterien durch atherosklerotische Plaques und/oder deren spontane Ruptur mit Thrombosierung, sowie Embolisierung des Thrombus/Plaque-Materials nach distal^[1]. Die Verlegung des arteriellen Stromgebietes führt dabei zur Unterbrechung der Sauerstoff- sowie Nährstoffzufuhr und somit zum akuten Myokardinfarkt.

Die Therapie der Wahl beim akuten ST-Hebungs-Infarkt ist die möglichst rasche Wiederherstellung der Perfusion in der stenosierten Arterie. Wenn nicht innerhalb von 2 Stunden nach Diagnose ein Krankenhaus mit PCI-Bereitschaft erreicht werden kann, so stellt die Fibrinolyse nach heutigen Leitlinien eine weitere Therapiemöglichkeit dar^[3]. Hauptsächlich wird die Akut-PTCA (perkutane transluminale Koronar-Angioplastie) zur Wiedereröffnung des Infarkt-Gefäßes mittels Ballon-Angioplastie und nachfolgender Stabilisierung durch Stents, eingesetzt. Die Akut-PTCA führt zu einer deutlichen Abnahme der Letalität beim akuten Myokardinfarkt und gilt heutzutage als Therapie der Wahl ^[4, 5].

1.2. Reperfusion, Reperfusionsschaden

Seitdem belegt ist, dass ischämisches Myokard durch die Wiederherstellung der Perfusion (Reperfusion) gerettet und die Funktionalität erhalten werden kann [6, 7], gilt die rasche Reperfusion als Therapie der Wahl bei Myokardischämie. Trotz Reperfusion wird dem Myokard ein gewisser Schaden zugeführt, allgemein als „Ischemic Reperfusion Injury“/Reperfusionsschaden bezeichnet. Dieser spezifische Schaden tritt bei beiden Behandlungsformen des AMI, Thrombolyse und PTCA, auf. Reperfusionsschaden wird allgemein definiert als „kardialer und vaskulärer Schaden, der direktes Resultat der Wiederherstellung der kardialen Perfusion von zuvor ischämischem Gewebe ist“ [8-11]. Der Beitrag des Reperfusionsschadens am Gesamtinfarkt beträgt bis zu 50 % [12, 13]. Dennoch ist die Reperfusion einer therapeutischen Zurückhaltung vorzuziehen [14]. Ob die Reperfusion dem Myokard reversiblen oder irreversiblen Schaden zufügt, scheint zeitlich abhängig von der Dauer der Ischämie zu sein: falls die Ischämie innerhalb von 20 min durch Reperfusion unterbrochen wird, ist der myozytäre Schaden noch reversibel, eine Reperfusion nach 20 min Ischämie führt zu irreversiblen Schäden an der Herzmuskelzelle [11]. Eine direkte Korrelation besteht zwischen Dauer der Ischämie und Infarktgröße, die sich während der Reperfusion einstellt [11].

Die Reperfusion bewirkt eine Dysfunktion von Kardiomyozyten mit weiteren negativen Veränderungen am Herzmuskel und vaskulären Endothel [15]: „Stunned Myocardium“, No-Reflow-Phänomen, Reperfusions-Arrhythmien, Lethaler Reperfusionsschaden [14-19]. (siehe Abb. 1)

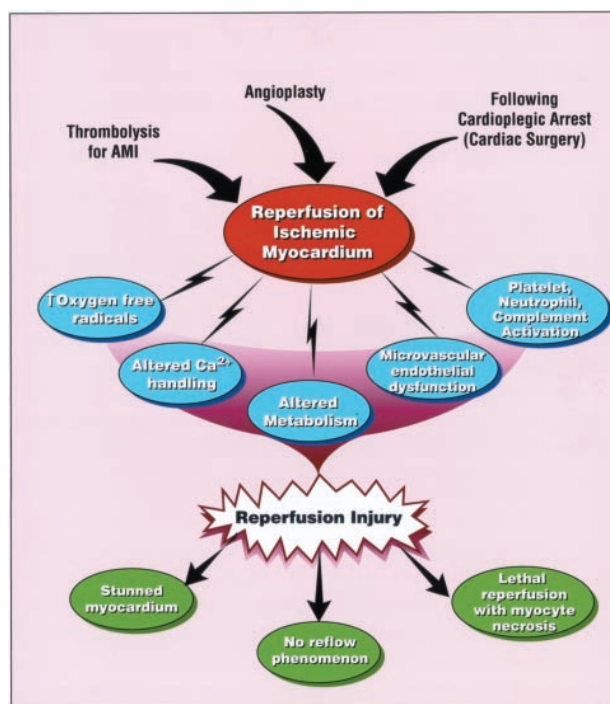


Abb. 1: Reperfusionsschaden und Mechanismen nach Verma et al, Circulation 2002

Der „Letale Reperfusionsschaden“ wird definiert als: „Schaden der durch die Wiederherstellung des Blutflusses nach einer Ischämie-Episode zum Tod von Zellen führt, die vorher nur reversibel durch die Ischämie geschädigt wurden“ ^[10]. Apoptose von Kardiomyozyten, welche in der Ischämie getriggert, in der Reperfusionssphase ausgeführt wird, trägt zum letalen Reperfusionsschaden bei ^[20].

Letaler Reperfusionsschaden kann im Experiment nicht an der selben Myokardprobe untersucht werden. Dies führt zur Frage, ob letaler Reperfusionsschaden überhaupt existiert, und ob der Zelltod nicht durch die Ischämie selbst stattgefunden hat ^[10, 21].

Es bestehen ausserdem Zweifel, ob das Konzept des Reperfusionsschadens vom Tier auf den Menschen ohne weiteres zu übertragen ist ^[21].

Pathophysiologisch muss allgemein zwischen direktem oder verzögertem Reperfusionsschaden unterschieden werden. Der direkte findet innerhalb der ersten Minuten der Reperfusion statt. Der verzögerte Schaden tritt erst im Verlauf, vor allem eingeleitet durch den Einfluss von Neutrophilen Granulozyten und deren vermittelte Entzündungsreaktion, auf ^[10]. Das hier vorgestellte tierexperimentelle Modell lässt auf Grund von 24 h Reperfusion sowohl die pathologisch direkten, als auch verzögerten Mechanismen zu. Reperfusionsschäden sind ein komplexes und

multifaktorielles Geschehen. Die genauen pathologischen Veränderungen, die während der Reperfusion initiiert werden, umfassen:

- a) Formierung radikaler Sauerstoff Spezies = ROS
- b) Endotheliale Dysfunktion und Mikrovaskulärer Schaden
- c) Veränderungen im zellulären Calcium-Haushalt, Calcium Überladung
- d) Normalisierung des Gewebe-pH
- e) Wiederherstellung der extrazellulären Osmolalität
- f) Akkumulation von Neutrophilen Granulozyten und Freisetzung von zytotoxischen Substanzen
- g) Veränderung des myokardialen Metabolismus (ATP-Mangel) [10, 14, 15, 22-25]

All diese Veränderungen haben (neben einem eigenen Schadensmechanismus) einen gemeinsamen pathologischen Endpunkt, welcher zum unmittelbaren Schaden der Zelle und der Mitochondrien innerhalb der ersten Minuten der Reperfusion führt: die Öffnung der „mitochondrial permeability transition pore“ = mPTP [12].

Die molekularpathologischen Ereignisse haben folgende sichtbare histopathologischen Veränderungen in der Reperfusion zur Folge: myofibrilläre Hyperkontraktur, Kontraktionsbandnekrosen, Zell-Schwellung und mechanische Zerstörung der Sarkolemmalen Membran, Schwellung von Mitochondrien und Calcium-Phosphat-Ablagerungen in Mitochondrien [9-11, 26].

1.2.1. ROS, reactive oxygen species

Reaktive Sauerstoff-Spezies werden von der NADPH Oxidase des vaskulären Endothels und der Neutrophilen Granulozyten, der Xanthinoxidase von Kardiomyozyten und durch die Monoaminoxidase und Elektrontransportkette der Mitochondrien gebildet [27-29]. Dies geschieht während Ischämie und Reperfusion [30]. ROS ziehen einerseits Neutrophile Granulozyten an, andererseits werden sie von ihnen gebildet [24]. Zu den ROS zählt man Superoxid Anionen ($\cdot\text{O}_2$), Hydrogen Peroxide (H_2O_2) und Hydroxyl Anionen ($\cdot\text{OH}$). ROS sind in der Lage die Akkumulation von Neutrophilen Granulozyten über eine Induktion von p-Selektin [31, 32] und GMP-140 [33] im vaskulären Endothel zu erhöhen. ROS können die Zellen durch

Peroxidation von Membran-Lipiden, Denaturierung von Proteinen, Enzymen und Ionenkanäle, sowie Strangbrüchen in der DNA, schädigen [34, 35]. Somit ist die Zellintegrität gefährdet mit den Folgen einer Membranruptur [36, 37]. Des weiteren vermindern ROS die Verfügbarkeit von NO [34]. NO kann unter normalen Umständen die Akkumulation von Neutrophilen Granulozyten hemmen, den koronaren Blutfluss verbessern, sowie ROS selber inaktivieren [12]. Darüber hinaus induzieren ROS eine Dysfunktion des Sarkoplasmatischen Retikulums, was zu einer Freilassung von Calcium aus dem SR führt und damit die Zelle mit Calcium überladen wird [38].

1.2.2. Calcium-Überladung

Die Calcium-Überladung der Zelle und des Mitochondriums erzeugt die Hyperkontraktur der Zelle, sowie die Öffnung der mPTP [12]. Die Überladung der Zelle mit Calcium erfolgt durch mehrere Mechanismen. Einerseits erhöht sich die zytosolische Calcium-Konzentration während der Ischämie, zum anderen steigt das intrazelluläre Calcium durch eine Ruptur der sarkolemmalen Membran, einer Dysfunktion des sarkoplasmatischen Retikulums, sowie durch die umgekehrte Funktion des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers in der Reperfusion [10, 12, 38, 39]. Zusammen mit der Verfügbarkeit von ATP in der Reperfusion kommt eine massive Kontraktion des myofibrillären Apparates zu stande, welche strukturelle Schäden der Zelle bedingt und den Zelltod durch Hyperkontraktur auslöst [10]. Zudem kann es zur Öffnung der mPTP durch die Überladung an Calcium kommen [40-43].

1.2.3. pH-Änderungen

Während der Ischämie befindet sich der Gewebe-pH im azidotischen Bereich. Hierzu trägt die anaerobe Energiegewinnung massgeblich bei. Ein niedriger pH hemmt nicht nur die Öffnung der mPTP, sondern auch die Aktivierung des myofibrillären Apparates. Während der Reperfusion wird Laktat aus dem Infarktgebiet herausgewaschen und trägt damit zur pH-Neutralisierung extrazellulär bei. Der pH-Gradient zwischen Zelle und Extrazellularraum führt zur Aktivierung des Na^+/H^+ Austauschers und des $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ Symporters. Natrium gelangt vermehrt in die Zelle hinein, wird durch den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher wiederum nach extrazellulär

transportiert, was in einer weiteren Belastung der Zelle mit Calcium resultiert. Zusätzlich fehlt die pH-vermittelte Hemmung der Myofibrillen [10, 44].

1.2.4. Änderungen der Osmolarität

Im Rahmen der Ischämie werden durch den anaeroben Metabolismus osmotisch aktive Substanzen angehäuft. Diese befinden sich im Infarktgebiet sowohl intra-, als auch extrazellulär. Durch das Herauswaschen der Substanzen während der Reperfusion, entsteht ein osmotisches Konzentrationsgefälle zwischen Zelle und Extrazellularraum [45]. Wasser fließt im Ausgleich zum Konzentrationsgefälle in die Zelle und lässt die Zelle anschwellen. Mit zunehmender mechanischer Belastung tritt schliesslich die Zellruptur ein [46].

1.2.5. Neutrophile Granulozyten

Verschiedenste inflammatorische Chemokine locken Neutrophile Granulozyten während Ischämie und Reperfusion an [24, 47, 48]. (siehe Abb.2) Die durch Chemokine aktivierten neutrophilen Granulozyten geben eine Vielzahl von Botenstoffen, Proteasen und ROS frei. Diese fügen dem Myokard, sowie dem vaskulären Endothel weiteren Schaden zu, was eine weitere Ausschüttung von Chemokinen zur Folge hat [49, 50]. Ausserdem kommt es durch die Ansammlung von Granulozyten in den Kapillaren zum sogenannten „No-reflow-Phänomen“ durch Embolisierung^[16] und dadurch zu sekundären Ischämien [51]. Die Schädigung des Endothels durch neutrophile Granulozyten führt ausserdem zu einer verminderten Fähigkeit des Endothels auf Acetylcholin zu reagieren. Die Fähigkeit zur Relaxation ist damit gestört [52]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass das Ausmass der Infarktgröße mit der Höhe der Akkumulation von PMN (Polymorph Neutrophils) zusammenhängt [53].

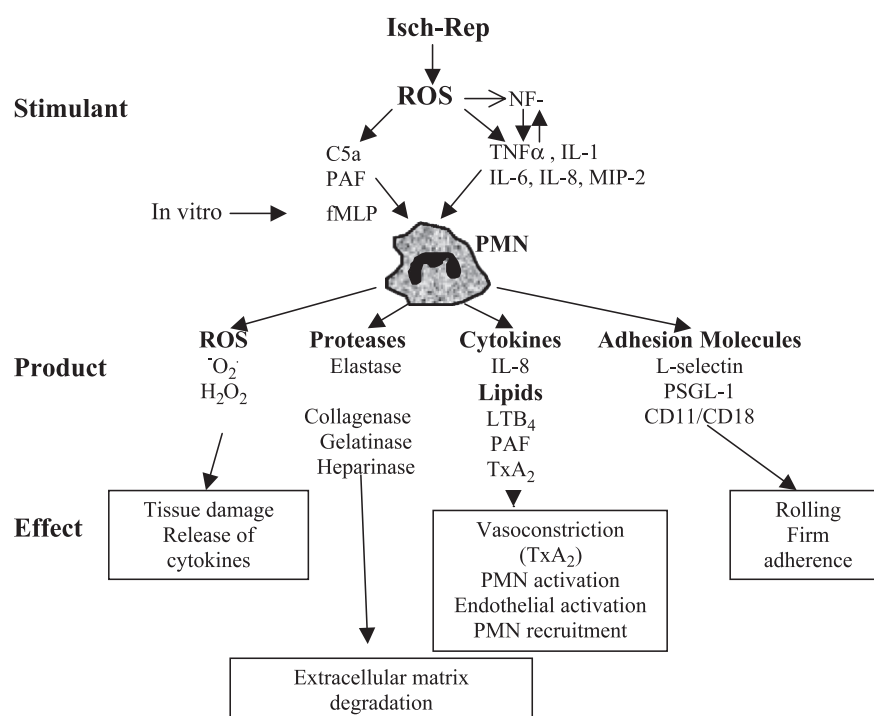


Abb.2: PMN und Signalwege, entnommen aus Vinten-Johansen et al, Cardiovasc Res 2004

1.2.6. Öffnung der mPTP

Die mitochondriale Permeabilitäts Transitions Pore (mPTP) ist ein Spannungs-, pH und Ca^{2+} - abhängiger Kanal in der inneren mitochondrialen Membran der Kardiomyozyten und anderer Zellen [43, 54]. Mögliche Bestandteile sind die Adenin-Nukleotid-Translokase (ANT), der spannungsabhängiger Anionen-Kanal (VADC) und der mitochondriale Phosphat-Carrier (PiC) [54]. Cyclophilin D wird nur als Modulator der mPTP angesehen [55]. Die mPTP öffnet in der frühen Phase der Reperfusion (siehe Abb. 4) [56]. Die Öffnung der mPTP wird induziert durch eine intrazelluläre Calcium-Überladung [40], ROS [57] und einer Veränderung des intrazellulären pH ins Basische (siehe Abb. 5) [58]. Durch die Öffnung der mPTP in der Reperfusion bricht das mitochondriale Membranpotential zusammen, die mitochondriale Permeabilität nimmt zu. Moleküle unter 1500 Dalton (Da) können daher die Membran passieren (siehe Abb. 3) [27]. Durch den Zusammenfall des Membranpotentials und die Öffnung der Membran kann die für die Elektronentransportkette und ATP-Produktion wichtige Differenz der Protonen nicht mehr aufrecht gehalten werden. Diese Veränderungen führen zur Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung, zur Bildung von ROS [59]

und zu einem Mangel an ATP [27]. Im Rahmen der Öffnung der mPTP können Mitochondrien bis zur Membranruptur anschwellen. Das dabei freigesetzte Cytochrom C, löst den apoptotischen Zelltod aus [60].

Gegensätzliche Mechanismen, die die Öffnung der mPTP verhindern sind ein niedriger pH, die Verhinderung der Bindung von Calcium an die „opening-trigger-site“, [42, 61, 62] Ischämische Prä,- als auch Postkonditionierung, sowie die Gabe von Ciclosporin A [63-65].

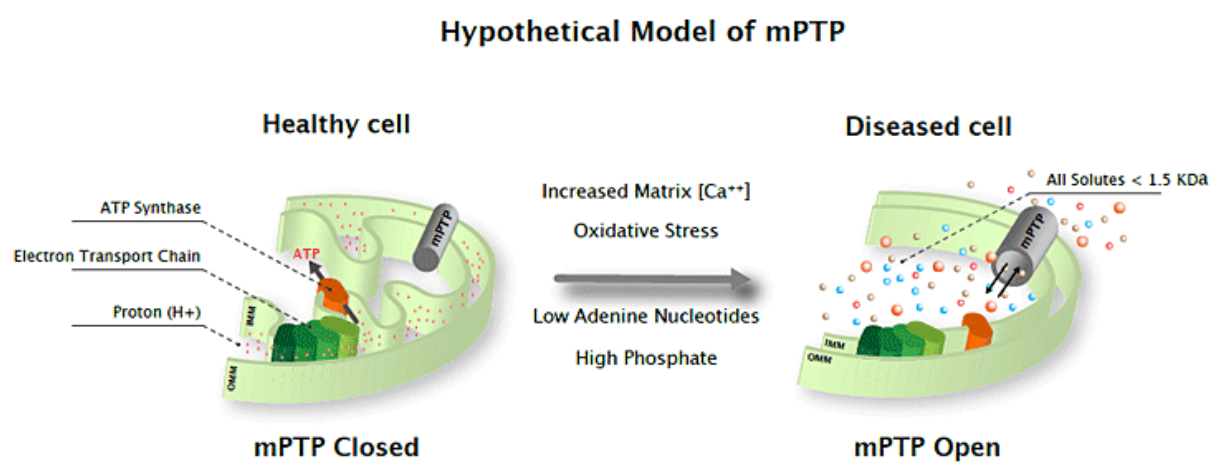


Abb.3: Schema mPTP und Konsequenzen, entnommen von Congenia S.r.l , Mailand, Italien

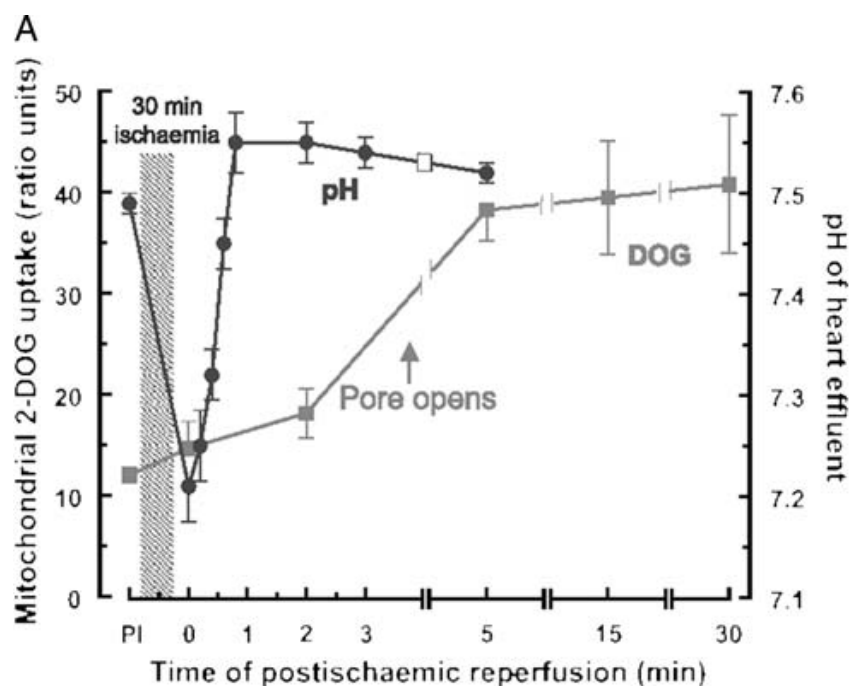


Abb.4: Öffnung der mPTP, entnommen aus Ovize et al., Cardiovasc Res 2009

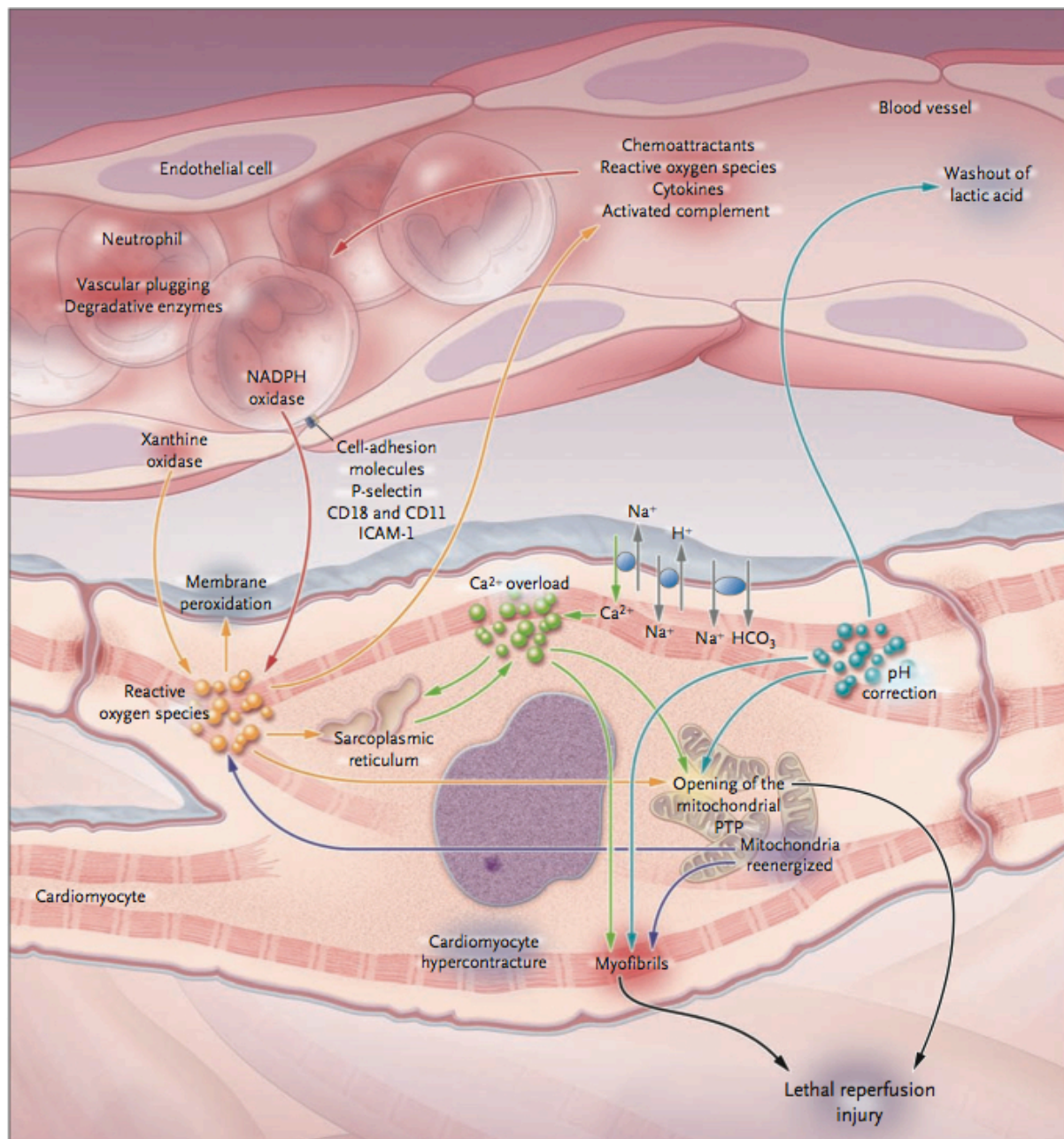


Abb.5: Übersicht Reperfusionsschaden, entnommen aus Hausenloy et al, N Engl J Med 2007

1.3. Kardioprotektion durch Prä- und Postkonditionierung

Zwei Beispiele der mechanischen Therapiemodelle zur Reduktion des Reperfusionsschadens sind die Ischämische Prä- und Postkonditionierung. Dies sind kurze Zyklen nicht schädigender Ischämie-Episoden. Hierbei wird der Blutfluss zum Herzen kurz unterbrochen. Das Konzept des ischämischen Präkonditionierens ist schon länger bekannt ^[66], wohingegen die Idee der ischämischen Postkonditionierung erst kürzlich aufgegriffen wurde ^[67].

1.3.1. Ischämische Präkonditionierung:

Obwohl eine Präkonditionierung per definitionem vor der Ischämie stattfindet, werden durch sie endogene kardioprotektive Mechanismen getriggert, die zu einer Minderung von Reperfusionsschäden nach der Index-Ischämie führen [68, 69]. Allgemein erfolgt durch die Präkonditionierung eine Reduktion von Reperfusions-Arrhythmien, eine Verlangsamung des Metabolismus während der Ischämie [70], eine Förderung der postischämischen myokardialen funktionellen Erholung (Schutz vor Stunned Myocardium) [71], ein Schutz des Koronarendothels und eine Reduktion der Infarktgröße [8, 66, 69]. Wichtig hierbei ist die Art des Präkonditionsstimulus [72]. Die molekularen Effekte der Präkonditionierung setzen zu unterschiedlichen Zeitpunkten ein [73, 74]: frühe Präkonditionierung erfolgt direkt nach Ischämie bis zu 3h danach und verhindert vor allem die Infarktentwicklung [68], verzögerte Präkonditionierung innerhalb eines Zeitfensters von 24-96h nach Ischämie und verhindert die Infarktentwicklung, sowie „myocardial stunning“ [69].

Molekulare Trigger der frühen Präkonditionierung sind: Adenosin, Epinephrin, Bradykinin, ROS und endogene Opioide. Sie triggern über eine Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren, PKC, sowie anderen Mediatoren, die Öffnung von mitochondrialen Kalium-ATP Kanälen (mitoK-ATP), was zur Bildung von ROS führt. (siehe Abb. 6)

Die exakten Endeffektoren der Präkonditionierung sind noch immer nicht genau bekannt. Als wahrscheinlichste Endeffektoren gelten derzeit mito-K-ATP-Kanäle, sowie die mPTP [70]. Die Öffnung der mitoK-ATP scheint nicht nur das Mitochondrium vor einer Calcium-Überladung während der Ischämie und Reperfusion zu schützen [75], sondern hat auch Einfluss auf die Funktion der mPTP und verhindert deren Öffnung in der Reperfusion [76, 77].

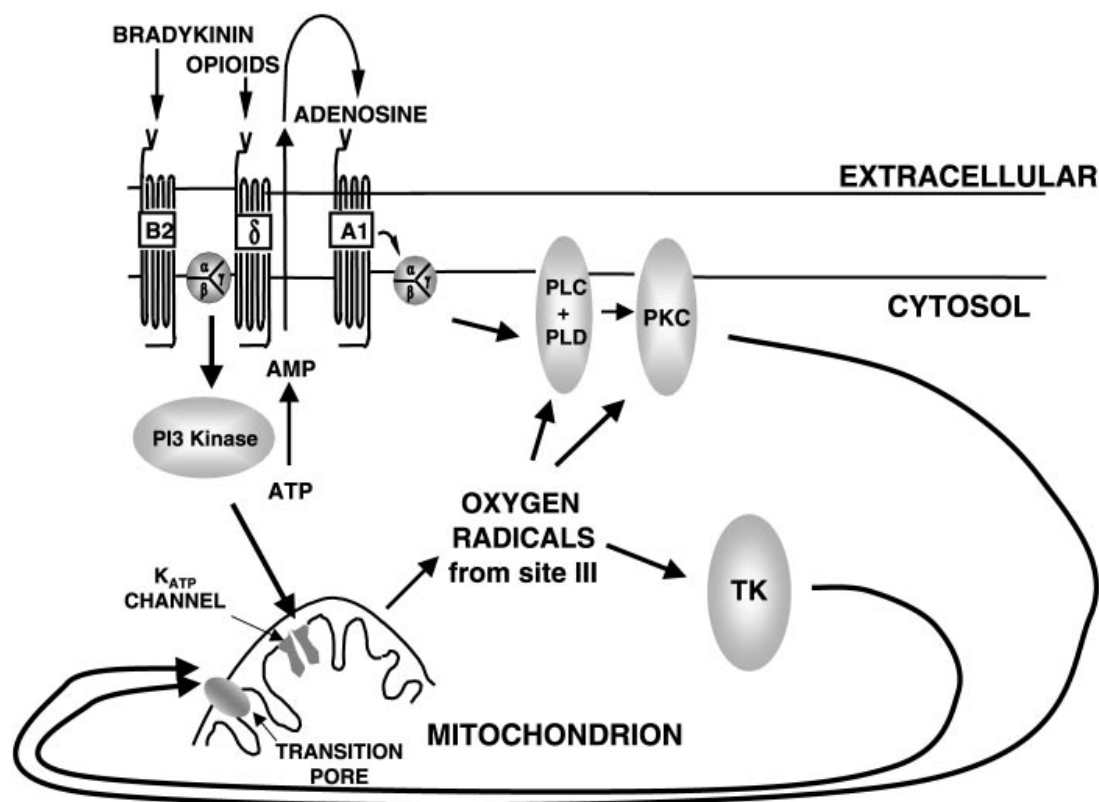


Abb.6: Schema des „early preconditioning“. Nach Yellon et al., Phys Rev 2003

Trigger der späten Präkonditionierung sind Adenosin, NO, ROS, Katecholamine und endogene Opiode (siehe Abb.7). Diese werden während der kurzen Ischämie der Präkonditionierung aktiviert und führen zur Aktivierung von kardioprotektiven Mechanismen zu einem späteren Zeitpunkt. Hierzu gehört die Translokation von folgenden Proteinen in den Zellkern: Proteinkinase C, Src Protein Tyrosin-Kinasen, Mitogen-aktivierte Proteinkinasen, Januskinase 1/2 und NFkB. Diese bewirken eine verstärkte Transkription von iNOS, COX-2, Aldose-Reduktase, HO-1 und Mn Superoxid-Dismutase [78, 79]. Zusätzlich spielen *mito*K-ATP-Kanäle eine Rolle als Endeffektoren [69]. Das Ischämische Präkonditionieren hat seinen Stellenwert vor allem in der experimentellen Forschung und in klinischen Szenarios, in denen die Ischämie-Episode antizipiert werden kann, wie z.B. in der Herzchirurgie (CABG) [70].

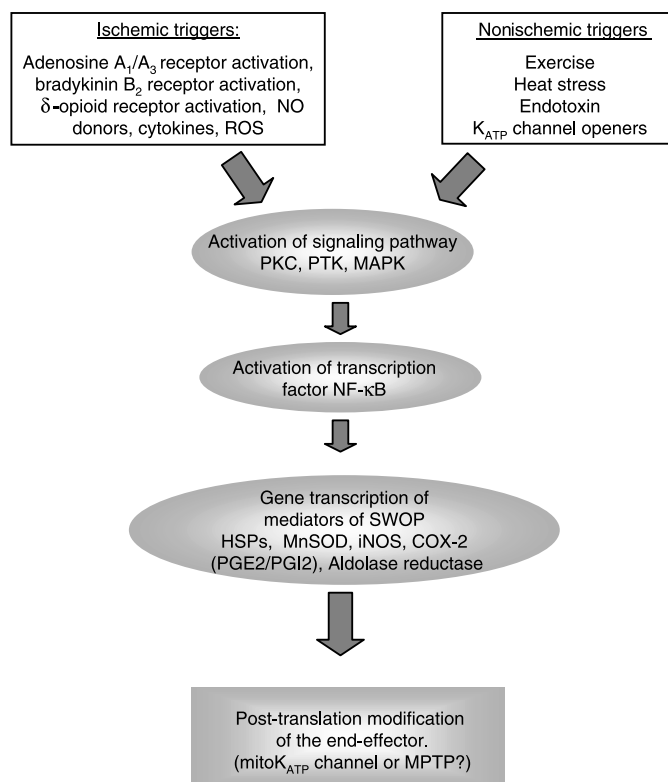


Abb.7: Schema des second window of protection = SWOP = „late preconditioning“. Nach Yellon et al., Phys Rev 2003

1.3.2. Ischämische Postkonditionierung:

Das Ischämische Postkonditionieren ist ein relativ neues Verfahren, welches den Reperfusionsschaden minimieren kann [67]. Die Idee, den Reperfluß an sich zu verändern, entstammt aus früheren Experimenten [80]. Mit der Postkonditionierung konnte allgemein eine Reduktion der Apoptose von Kardiomyozyten, der Kontraktur, der koronarendothelialen Dysfunktion, dem mikrovaskulären Schaden, Gewebeödem und Organellen-Dysfunktion gezeigt werden [27, 67, 81].

Der Vorteil des Ischämischen Postkonditionierens liegt in der klinischen Anwendbarkeit. Ischämische Postkonditionierung wird direkt nach der Ischämie zur Beeinflussung der Reperfusion angewandt [82].

Das mechanische Manöver wird als kurze Episoden Reperfusion mit alternierenden Re-Okklusionen verstanden. Dies hat in den ersten Minuten der Reperflußphase zu erfolgen, da sonst kein positiver Effekt erzielt wird und endogene kardioprotektive Mechanismen nicht getriggert werden können [83-85].

Offenbar besteht ein Zusammenhang zwischen Ischämiezeit und Effekt des jeweiligen Postkonditionierungsschemas [86]. So sind einzelne Postkonditionierungszyklen bei einer gewissen Länge der Ischämie wirksam, der gleiche Zyklus bei einer anderen Ischämiezeit aber ineffektiv [87]. Dieser muss dann durch Veränderung der Länge oder Häufigkeit eines Postkonditionierungszyklus angepasst werden, um einen ausreichenden kardioprotektiven Effekt zu erreichen [88, 89]. Ein ähnlicher Zusammenhang gilt auch für das Ischämische Präkonditionieren [72].

Die getriggerten molekularen Mechanismen ähneln weitestgehend denen der Ischämischen Präkonditionierung und führen im Tiermodell zu einer vergleichbaren Infarktgrößenreduktion [67]. Ob Ischämische Prä- und Postkonditionierung sich in ihrem Effekt addieren ist jedoch umstritten [81, 84, 90].

Die kardioprotektiven Mechanismen der ischämischen Postkonditionierung lassen sich grob in zwei Kategorien unterteilen: aktive und passive Mechanismen [86, 90]. Der „passive“ Teil wird durch die mechanisch verzögerte Reperfusion bestimmt: pH-Veränderung [91-94], Einwanderung, Anzahl und Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten und Expression von p-Selectin [67], ROS-Bildung [95] und Calcium-Überladung werden reduziert [96].

Durch die Beibehaltung, bzw. Verlängerung der extra- und intrazellulären Azidose während der Reperfusion wird eine Aktivierung des Na^+/H^+ -Austauschers und des $\text{Na}^+/\text{Bikarbonat}$ -Kotransporters zum Ausgleich der intra- und extrazellulären Azidose verhindert und damit eine Na^+ - und Ca^{2+} -Überladung der Zelle [27]. Zudem bewirkt die Verlängerung der Azidose eine Inhibierung der kontraktilen Aktivität, der Hyperkontraktur und es reduziert die Kommunikation über gap-junction, die zum Zelltod führen kann [97]. Des weiteren scheint ein niedriger pH die Öffnung der mPTP zu hemmen [91, 92]. Ein anderer Mechanismus, der durch die Beibehaltung der Gewebeazidose wirkt, ist die Hemmung von Calpainen und der damit verbundenen Calpain-Proteolyse [97]. Calpaine sind Ca^{2+} und pH-abhängige Proteasen, die strukturell myofibrilläre und sarkolemmale Proteine als Substrat haben. Eine Aktivierung von Calpainen führt zum Verlust der Zellintegrität während der Reperfusion [98].

Der „aktive“ Teil beinhaltet vor allem die Initiierung des RISK-pathway (reperfusion injury salvage kinase) [84, 90, 99, 100] und SAFE - pathways [101-104] (siehe auch Abb.8). Die Postkonditionierung verhindert das schnelle Herauswaschen von endogenem

Adenosin ^[105, 106], Bradykinin ^[107] und endogenen Opioiden ^[108] aus dem Gewebe, die sich während der Ischämie angesammelt haben. Diese können nun vermehrt an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren binden, über die eine Aktivierung von PI-3K-AKT mit nachfolgender Phosphorylierung von Akt, eNOS und p70S6K erzeugt wird ^[90]. Über diesen Weg kann einerseits die Phosphorylierung von GSK3 β gehemmt werden ^[109], andererseits wird durch die Aktivierung der eNOS vermehrt NO gebildet, welches zum Schliessen der mPTP in der Reperfusionsphase führt. Die Inhibition von GSK3 β durch p70S6K vermittelt eine Inhibition der mPTP ^[110].

Darüber hinaus findet im Rahmen des RISK-Pathways eine Aktivierung von ERK1/2= p42/p44 MAPK statt ^[111]. Hierüber wird p70S6K aktiviert, welches GSK3 β phosphoryliert und letzteres wie oben erwähnt kardioprotektiv inaktiviert. Ob der RISK - pathway wirklich in allen Spezies aktiviert wird ^[112] oder, falls aktiviert, auch einen kardioprotektiven Effekt besitzt, ist umstritten ^[99]. Dies gilt vor allem für das experimentelle Schweinemodell ^[113] und die Übertragung auf den Menschen ^[100].

Zum anderen wird dem SAFE-pathway ein kardioprotektiver Effekt zugesprochen ^[104, 114]. Der SAFE-pathway kann eventuell durch Ischämische Postkonditionierung getriggert werden ^[115]. SAFE agiert unabhängig vom RISK - pathway ^[103]. In der SAFE-Signalkaskade kommt es zur Aktivierung von Januskinasen durch TNF α und anderen Zytokinen (IL-6), über die wiederum der STAT3-Signalweg initiiert wird ^[102-104]. STAT3 hat mehrere mögliche Downstream-Targets, welche kardioprotektiv wirken können: Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Fas, cyclin D1, E1, p21, Wachstumsfaktoren wie VEGF, GSK3 β , Connexin 43 und andere Transkriptionsfaktoren ^[102]. Eine Interaktion (crosstalk) der beiden Signalkaskaden RISK und SAFE ist möglich ^[115-117]. Die Frage welchen Einfluss Ischämische Postkonditionierung auf TNF α im Rahmen des SAFE-Pathways hat, ist nicht geklärt ^[95].

Zentrale Endeffektoren der Kardioprotektion im Rahmen Ischämischen Postkonditionierung scheinen allgemein die mPTP und die mito-K-ATP-Kanäle zu sein ^[118]. Zum einen werden durch Postkonditionierung mito-K-ATP-Kanäle geöffnet ^[84, 119] zum anderen die mPTP während der Reperfusion geschlossen ^[65, 119]. Durch die Öffnung der mito-K-ATP-Kanäle, werden wahrscheinlich geringe Mengen an ROS gebildet, die zu einer Schliessung der mPTP führen ^[120].

Abseits der bisher genannten Mechanismen scheinen in der ischämischen Postkonditionierung auch NO und PKC eine wichtige Rolle zu spielen.

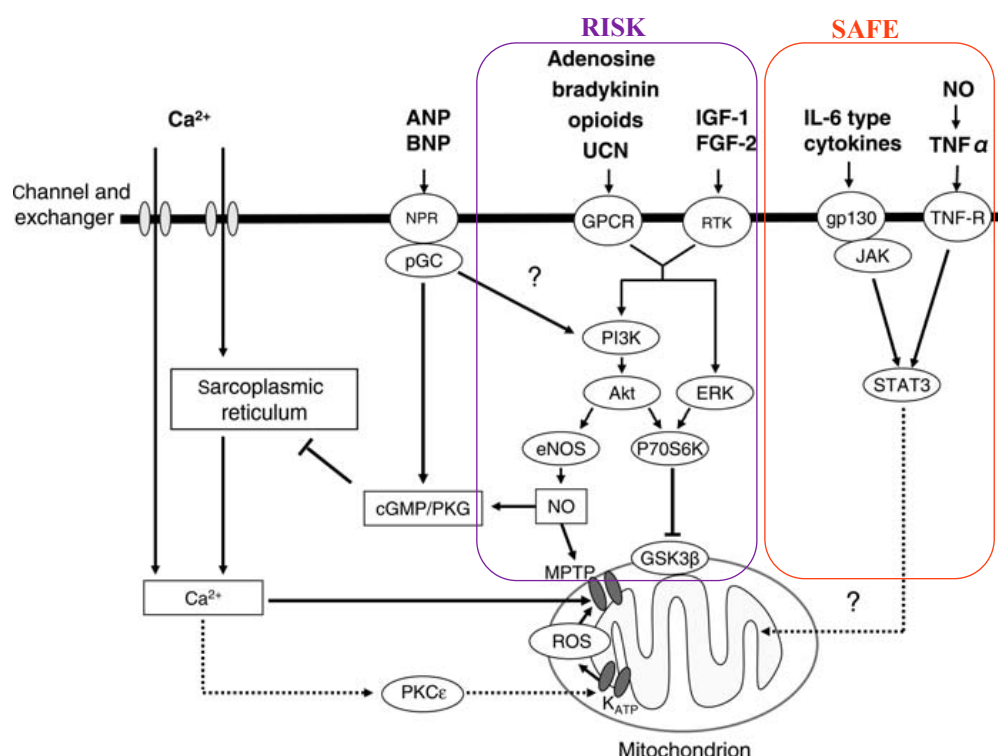


Abb.8: kardioprotektive Mechanismen der Postkonditionierung, modifiziert nach Ovize et al, Cardiovasc Res 2010

1.4. CsA als Inhibitor der mPTP

Ciclosporin A (CsA), entdeckt 1970 in einem Pilz namens *Tolypocladium inflatum*, ist ein zyklisches Peptid, welches immunsupprimierend wirkt ^[121]. Der immunsuppressive Effekt wird über die Bindung an Cyclophilin A (Cyp A) und die Inhibition von Calcineurin vermittelt ^[122]. Dies hemmt die T-Zell-Proliferation, sowie die Ausschüttung von Zytokinen, welche sonst durch Aktivierung von NF-AT (nuclear factor of activated T-cells) transkribiert würden. Allgemein kann CsA an Cyp A, Cyp B und Cyp D binden. Zunächst wurden Beobachtungen gemacht, dass die Gabe von CsA die mitochondriale Respiration und auch den Calciumfluss aus dem Mitochondrium blockieren kann ^[123, 124]. Später konnte man diese Eigenschaft auf die Hemmung der Öffnung der mPTP zurückführen. Dabei kommt es zu einer Bindung von CsA an Cyclophilin D. Hierdurch wird die Bindung von CypD an die Pore unterbunden und eine Konformationsänderung der Pore, die Öffnung, wird unterbunden ^[41, 55, 125, 126]. Weiterhin wurde gezeigt, dass die mPTP während Ischämie geschlossen ist, in der Reperfusionsphase jedoch öffnet ^[56]. Oxidativer

Stress (ROS), Calcium-Überladung, hohe Phosphat-Konzentrationen und pH-Veränderungen tragen dazu bei (siehe 1.2.2.). Eine Hemmung der mPTP in der frühen Reperfusionphase durch CsA hat sich als kardioprotektiv erwiesen [76]. Falls die CsA als kardioprotektives Pharmakon eingesetzt werden soll, muss dies in den ersten Minuten der Reperfusion geschehen. Die derzeitigen Studien sind in ihrer Aussage noch uneinheitlich. Einerseits wird ein positiver Effekt von CsA auf den Reperfusionsschaden in Modellen, wie Zellen [127], Schweinen [128] und Menschen [64] beschrieben. Neuere Studien erheben jedoch Zweifel, ob CsA einen kardioprotektiven Effekt im Schweinemodell besitzt [129-131].

In den veröffentlichten tierexperimentellen und klinischen Studien erfolgte nur eine Bolusapplikation von CsA vor der Reperfusion. Durch die einmalige Gabe kann höchstwahrscheinlich von Nebenwirkungen Ciclosporins abgesehen werden [64]. Häufige Nebenwirkungen beim Menschen, die durch die Langzeiteinnahme von Ciclosporin auftreten können, sind arterielle Hypertonie, Atherosklerose, Hyperurikämie, Hypertrichosis, Gingiva-Hyperplasie, Hyperlipidämie, Parästhesien, Magen-Darm-Beschwerden. Desweiteren ist CsA nephro-, hepato-, und neurotoxisch.

1.5. Aktuelle klinische Studien IPoc und CsA

Das Konzept des Ischämischen Postkonditionierens wurde nicht nur tierexperimentell angewandt, sondern mittlerweile auch beim Menschen in klinischen „proof-of-concept“ - Studien [82, 132-138]. Durch IPoc konnte am Menschen eine geringere Freisetzung von CK [82, 139, 140], eine geringere Apoptose-Rate [141], eine Verbesserung der Endothelfunktion [139], eine Verbesserung der myokardialen Perfusion [132], schnellere ST-Segment-Erholung [132, 140] gezeigt werden. Die Gruppe um Thibault et al. wies dabei nach, dass Effekte der Postkonditionierung 6 Monate und 1 Jahr nach Infarkt noch präsent im Vergleich zu einer Kontrollgruppe waren [135]. Hier wurde nach 6 Monaten die Infarktgröße mittels ²⁰¹Thallium SPECT gemessen. Zusätzlich wurde die linksventrikuläre kontraktile Funktion nach 1 Jahr untersucht. Beide Untersuchungen zeigten einen Benefit in der Postkonditionsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe.

Eine Studie von Freixa et al. zweifelt den Effekt der Ischämischen Postkonditionierung am Menschen an. In der Studie wollte man den Kurzzeit- und Langzeiteffekt der Postkonditionierung untersuchen. Hierfür wurden nach 1 Woche und nach 6 Wochen post PTCA jeweils ein kardiales MRT zur Bestimmung der Infarktgröße, der LVEF und des „myocardial salvage index“ ($\text{AAR Ausmass} - \text{Infarktgröße} / \text{AAR-Größe}$), durchgeführt. Es konnte keine Reduktion der Infarktgröße oder eine Verbesserung der LVEF durch Postkonditionierung gezeigt werden. Der myocardial salvage index war in der IPoc-Gruppe sogar schlechter ^[138].

Trotz bereits vorhandener klinischer Studien und dem zahlenmässig umfassenderen Nachweis eines positiven Effekts durch Postkonditionierung am Menschen, fehlen umfassende Daten, die den Gewinn dieser Methode aufzeigen. Die größte Limitation der bisherigen Veröffentlichungen ist dabei die geringe Anzahl der eingeschlossenen Patienten ^[135].

Neben der Postkonditionierung gibt es Studien, die den Einfluss von Ciclosporin A auf den Reperfusionsschaden testen ^[64, 142]. CsA führt danach zum Zeitpunkt der Reperfusion zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße und zu einer gewissen Reduktion des linksventrikulären endsystolischen Volumens im Vergleich zu Kontrollen ^[142]. Die erste an Menschen erfolgte CsA-Studie ergab eine geringere CK-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle. Auch die Infarktgröße, als „area of hyperenhancement“ (MRT) bezeichnet, war in dieser Studie geringer als in der Kontrollgruppe. Auch hier beschränkt die geringe Patientenzahl eine definitive Aussage. Eine Metaanalyse von Lim et al. beschäftigt sich mit der Effektivität von CsA in präklinischen Tiermodellen. In allen angeführten Modellen, ausgenommen dem beim Schwein, konnte eine Infaktreduktion durch CsA im Vergleich zu Kontrollen, gezeigt werden ^[131].

1.6. Fragestellungen

a) Modell, neu: 60 min Ischämie, 24 h Reperfusion, 6x20sec IPoc

In den bisher durchgeführten tierexperimentellen Versuchen zum Reperfusionsschaden und dessen Therapie dominierten vor allem Maus-, Ratten- und Kaninchenversuche. Versuche an Hunden, Schweinen und Affen machen dagegen nur einen kleinen Teil der tierexperimentellen Versuche aus. Zwar existieren

Versuchsprotokolle mit 60 min Ischämiezeit, jedoch mit anderen Reperusionszeiten, sowie unterschiedlichen IPoc-Interventionsformen [87]. Ein weiterer Unterschied ist die Art der Ischämieinduktion (Ischämieform), sowie die Frage nach einem „open chest -oder „closed chest model“. In einigen Gruppen wird die Ischämie am open chest model des Schweins mit einer Ligatur der Koronararterie und nur mit einem Okklusionsgrad von 95% vollzogen (low-flow-Ischämie) [112, 113, 128]. Das „open chest-Modell“ bedingt ausserdem, dass der Versuch nicht über längere Zeit durchgeführt werden kann, ermöglicht jedoch z.B. in vivo Myokardbiopsien zur weiteren molekularbiologischen Diagnostik via Western Blot, etc. [112].

In unseren Experimenten haben wir bewusst ein „hartes Ischämie-Modell“ (no-flow-Ischämie) mit „closed-chest-approach“ zur 24h-Beobachtung (Reperfusion) gewählt. Hiermit kann eine maximale Anhäufung der Neutrophilen Granulozyten im entzündeten/ischämischen Myokardareal zugelassen und beobachtet werden [49]. Nachteil ist allerdings, dass die Ereignisse, die sich direkt in den ersten Minuten der Ischämie im Myokard abspielen, nicht beobachtet werden können.

Neu in unserem no-flow Modell ist die Anwendung eines Ischämischen - Postconditioning - Protokolls mit alternierend 6 x 20 sec IS/Rep. Dies wird sonst vergleichbar nur in einem low-flow Modell angewandt.

b) Vergleich von IPoc und pharmazeutischen Therapien im gleichen Modell

Zudem war es Ziel dieser Studie, die Effekte von IPoc und Ciclosporin A, systemisch oder per Retroinfusion appliziert, zu vergleichen und eine favorisierende Therapie zu finden.

c) Retroinfusion

Die selektive Retroinfusion (ohne Absaugung) von Genvektoren oder Pharmazeutika führt zur lokalen Konzentrationserhöhung im anvisierten Myokardareal [143]. Im hiesigen Modell soll der Frage nachgegangen werden, ob Ciclosporin A, als Inhibitor der mPTP, wenn im koronarvenösen System und Gewebe angereichert, einen vorteilhaften Effekt gegenüber der systemischen Applikation besitzt.

d) RISK

Ausserdem wurde untersucht, ob es im Rahmen der Ischämischen Postkonditionierung zu einer Aktivierung des RISK-Pathways im Sinne einer Phosphorylierung von AKT; GSK3 β und ERK1/2 kommt.

2. Methoden

2.1. Versuchsbeschreibung/Regularien

Das Versuchsvorhaben wurde durch die Regierung von Oberbayern genehmigt (AZ 55.2-1-54-2531-138/09) und nach dem deutschen Tierschutzgesetz von 1986 durchgeführt. Die Versuche stellen Kurzzeitversuche dar, die nach 24 Stunden beendet wurden. Im Folgenden werden die genauen Verfahrensweisen am Versuchstag eins und Versuchstag zwei (nach 24 h) erläutert.

Insgesamt wurden die Tiere in vier Gruppen aufgeteilt, wobei Gruppe 1 als Kontrolle diente, in Gruppe 2 wurde das Ischämische Postconditioning als Therapieform gewählt, in Gruppe 3 wurde Ciclosporin i.v. als pharmazeutisches Postconditioning eingesetzt, in Gruppe 4 wurde Ciclosporin A über einen Retroinfusionskatheter appliziert.

2.2. Versuchstag 1

2.2.1. Vorbereitung, Narkose und Überwachung der Vitalparameter

Für die Versuche wurden Schweine der Rasse „Deutsches Landschwein“ verwendet. Das mittlere Gewicht der Tiere betrug: 25 kg +/- 5kg. Die Einleitung der Narkose fand im Tierstall des Walter-Brendel-Instituts für experimentelle Medizin statt. Hierfür wurde den Versuchstieren jeweils 0,5 mg Atropinsulfat (B.Braun Melsungen, BRD), 10 mg/kg KG Azaperone (Jansen CILAG GmbH, Neuss, BRD), sowie 20 mg/kg KG Ketamin (Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, BRD) i.m. in die Nackenmuskulatur injiziert. Nach Legen einer peripheren Verweilkanüle (blau, 20G) in eine Ohrvene wurden 5mg Midazolam (Ratiopharm GmbH) und 1ml Fentanyl (Janssen Pharma) i.v. verabreicht, um eine ausreichende Narkosetiefe und Analgesie zu erreichen. Die endotracheale Intubation wurde mittels Laryngoskop und Tuben in den Größen 6,0 – 7,5 Inches durchgeführt. Die Tiere wurden zunächst manuell, bis zum Anschließen an das Gasnarkosegerät im OP, mittels Ambu-Beutel zwischenbeatmet. Zur Aufrechterhaltung der Narkose am OP-Tisch wurden die Tiere mit 240-320 mg/h Propofol i.v. (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, BRD) hypnotisiert, sowie mit Sauerstoff unter Beimischung von 0,8-2% Isofluran (Abbott GmbH & Co Kg) beatmet (Ventilog®, Dräger, Lübeck, BRD). Die Beatmung wurde auf folgende Volumina und

Drücke eingestellt: Atemminutenvolumen 5l/min; Atemfrequenz 18/min; Beatmungsdruck 19 mmbar; 40-60% FiO₂. Die Tiere wurden anschließend auf dem OP-Tisch im Großtier-OP waagrecht mittels Seilen fixiert. Die Überwachung der Vitalparameter der Tiere erfolgte zunächst mittels EKG und Pulsoxymeter. Das vierpolige EKG wurde an die Extremitäten der Tiere, das Pulsoxymeter an den Schwanz, angeschlossen. Der Blutdruck wurde nach Einführen einer 9F Schleuse (Cordis®, Reading, Miami, USA) in die rechte oder linke Arteria Carotis über einen Druckabnehmer (Stetham Transducer, Hellige-Monitor, Freiburg, BRD) kontinuierlich gemessen. Die Tiere wurden vor operativem Versuchbeginn mit sterilen Tüchern abgedeckt.

2.2.2. Antikoagulation, Antibiose

Die Schleusen, die jeweils in die seitliche Halsarterie- und Vene platziert wurden, sowie die für den Versuch benutzten Katheter, stellen thrombogenes Material dar. Um eine Thrombosierung zu vermeiden, wurde den Schweinen vor dem Legen der Schleusen 10.000 IE Heparin i.v. (B.Braun Melsungen GmbH, BRD) verabreicht. Zur perioperativen Antibiose wurden 1,5 g Cefuroxim-Natrium (HIKMA Pharma GmbH, London, UK) als Einmaldosis am Ende des ersten Versuchstags i.v. verabreicht.

2.2.3. Infusionen

Während den Operationen wurde den Versuchstieren isotone Kochsalzlösung (NaCl) 0,9% (B.Braun Melsungen AG, BRD), versehen mit 5 mg Magnesiumsulfat - Heptahydrat (Inresa Arzneimittel GmbH, London, UK) pro 500 ml NaCl, infundiert. Die Tiere erhielten ebenfalls Infusionen Hydroxyethylstärke 6% (Voluven® 6% Fresenius Kabi Deutschland GmbH) mit 150 mg Amiodaronhydrochlorid (sanofi aventis) pro 500ml Voluven® 6 % Infusionslösung (Amiodaron wurde als antiarrhythmische Präventivgabe verabreicht).

2.2.4. Gefäßzugänge

Als arterielle und venöse Gefäßzugänge für die Katheter wurden die zervikalen Gefäße A. carotis und V. jugularis externa ausgewählt. Hierzu wurde der M.

sternocleidomastoideus aufgesucht und im Anschluss eine etwa 5 cm großen Hautinzision mittels Elektrokauter durchgeführt. Medial des M. sternocleidomastoideus wurde die A. carotis, lateral des Muskels die V. jugularis externa aufgesucht, sowie stumpf und mit chirurgischen Instrumenten freipräpariert. Die Gefäße wurden kranial ligiert (Ethicon®- Permahanad – Seide – nicht resorbierbaren Fäden, Johnson&Johnson Intl.). Nach Inzision der Gefäßwände, kaudal der Ligatur, erfolgte die Einführung der jeweiligen Schleusen. Verwendet wurde für die A. carotis eine 8F Schleuse (Cordis Avanti®, 8F [blau], 11 cm, Cordis Corporation, Miami, FL, USA) und für die V. iugularis externa entweder eine 9F oder 11F Schleuse (Cordis Avanti®, 9F [schwarz] bzw. 11F [gelb], 11 cm, Cordis Corporation, Miami, FL, USA). Wenn am ersten Tag die Schleusen rechts cervical gelegt wurden, so erfolgte dies am zweiten Tag links cervical. Am Ende eines jeden Versuchstages wurden die Gefäße mittels Ethicon®- Permahanad – Seide – nicht resorbierbaren Fäden (Johnson&Johnson Intl.) komplett ligiert.

2.2.5. Angiographie und Druckmessung

Die linksventrikuläre Angiographie (siehe Abb.9) wurde über eine arterielle Schleuse über einen 6F Pigtail-Katheter (Cordis® Pigtail, 6F, Cordis Corporation, Miami, FL, USA) in den linken Ventrikel vorgenommen. Über den Pigtail-Katheter wurde anschließend unter Röntgen-Durchleuchtung (C-Bogen, Siemens, München, BRD) iodhaltiges Kontrasmittel Iomeprol (Imeron® 350, Bracco Imaging Deutschland GmbH) in den linken Ventrikel appliziert und dabei eine Bildfolge der Angiographie mittels Cine-Funktion des C-Bogens (EXOSCOP 8000, Ziehm Imaging GmbH, Nürnberg, Deutschland) in 60 Grad-Kippung aufgenommen. Danach wurde über die venöse Schleuse ein externer Pacer (Medtronic® 5375 Demand Puls Generator, Medtronic Inc. Minneapolis, MN, USA; Pacer-Kabel: Swan-Ganz Bipolarer Stimulationskatheter D97130F5 mit J-förmiger Spitze, Edwards Lifesciences, USA) eingeführt und im lateralen Bereich des rechten Vorhofs, unterhalb des rechten Herzohrs, platziert. Die linksventrikuläre Angiographie wurde bei einer Pacingfrequenz von 130/min wiederholt (siehe Abb.10). Im Anschluss der Versuche wurde die Ejektionsfraktion des linken Ventrikels anhand der aufgenommenen Bilder mittels QuantCor Analysesoftware (QuantCor LVA 5.0, QCA Software, Siemens Healthcare, Katheterlabor der Medizinischen Klinik I, Klinikum Grosshadern) für

jedes Tier bestimmt. Der 6F Pigtail-Katheter wurde entfernt und durch einen 6F Pigtail- Conductance -Katheter (Multi- Elektrodenkatheter, Millar pressure tip catheter SPC 560, Millar Transducer Control Unit MIL-TC-510, Millar Instruments, Texas, USA) ausgetauscht. Dieser wurde zur Messung von LVEDP, dp/dt und $dLVP/dt$ ebenfalls im linken Ventrikel, im Apexbereich, platziert. Die Druck-Messungen wurden sowohl unter Ruhebedingungen (Ruhefrequenz des Herzens) , als auch unter rechtsatrialem Pacing bei einer Pacingfrequenz von 130/min durchgeführt. Alle Daten wurden kontinuierlich aufgezeichnet und gespeichert (Leycom Sigma-5DF, Cardiodynamics, Zoetermeer, Niederlande) [144, 145].

Der Aortendruck wurde gleichzeitig kontinuierlich über die arterielle 8F Schleuse (Cordis®, Reading, Miami, USA) mittels einem Druckabnehmer (Stetham Transducer, Hellige-Monitor, Freiburg, BRD) gemessen und im gleichen Programm (Cardiodynamics, Zoetermee, Niederlande) aufgezeichnet und gespeichert (Pentium 200MHz, HSE, March-Hugstetten, BRD). Der Computer analysierte aus den im Programm aufgezeichneten Daten die Anstiegsgeschwindigkeit des linksventrikulären Druckes: $dLVP/dt$ ($LVdevP/dt$) [144, 145].

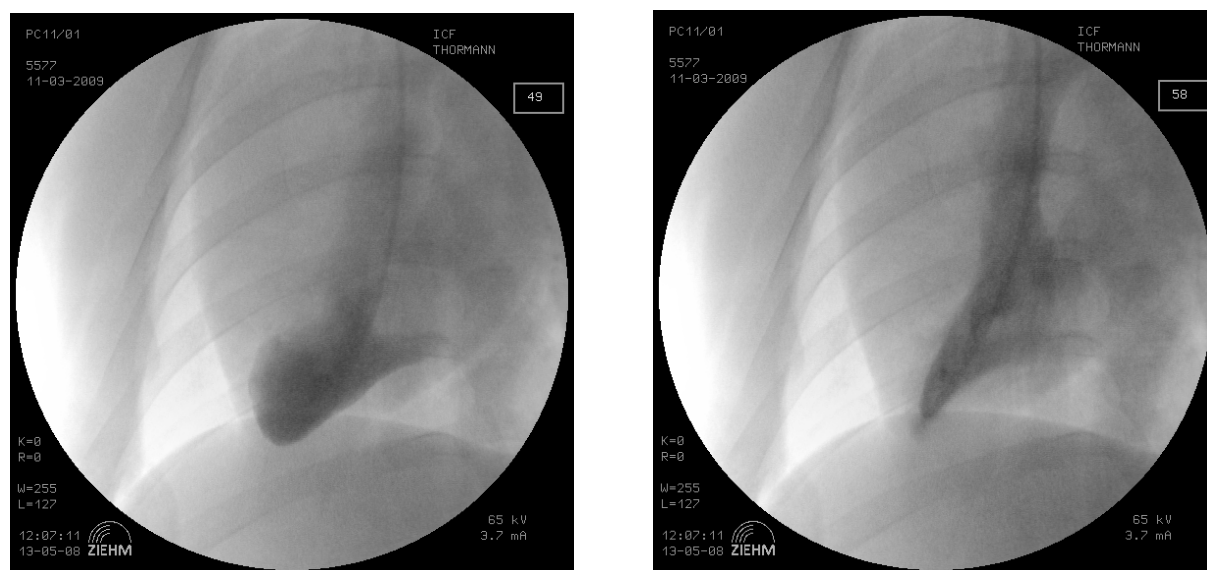


Abb. 9: Linksventrikuläre Angiographie in Ruhe

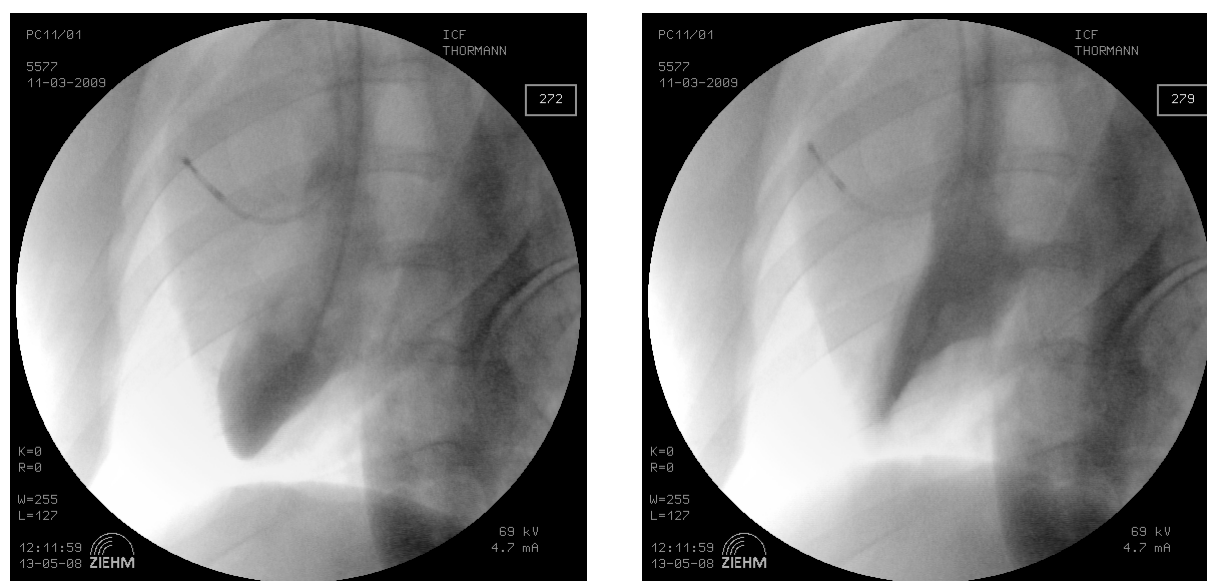


Abb. 10: linksventrikuläre Angiographie unter rechtsatrialem Pacing (HF 130/min)

2.2.6. Infarktinduktion und Therapie

Zur Infarktinduktion wurde die LAD (=left anterior descendens; Ramus interventricularis anterior) mittels Ballonkatheter für 60 Minuten verschlossen (siehe Abb. 11). Hierfür wurde zunächst ein 6 F Judkins rechts-Katheter mit Sideholes (Cordis® VISTA BRITE TIP® Guiding Catheter JR 4 SH, 6F, 100 cm, 2 Sideholes, Cordis Corporation, Miami, FL, USA) über die arterielle Schleuse in die linke Koronararterie (LCA) platziert. Über den Judkins rechts-Katheter wurde ein 0,0141 Führungsdraht (Shinobi® Plus Steerable Guidewire, 14 inch, 180 cm, Cordis Corporation, Miami, FL, USA oder ASAHITM MIRACLEbroSTM 6 Guidewire, 14 inch, 180 cm, Abbott Vascular® Devices, ASAHI Intec Co., Seto, Japan) in die LAD eingeführt, über den anschließend ein 3,0 mm (Durchmesser) und 10 mm (Länge) PTCA-Ballonkatheter (Magic® 3.0/10 oder Lekton Motion® 3.0/10, beide Biotronik, Berlin, Deutschland bzw. Maverick 2TM monorailTM PTCA Dilatation Catheter 3.0/10, Boston Scientific Corporation, Natick, MA, USA) eingeführt werden konnte. Der Ballon wurde bei jedem Versuchstier distal des ersten Diagonalast (1. DA) der LAD zur Ischämieinduktion mit einem Druck von ca. 4-6 atm mittels In-/Deflator (Road Runner Extra Support, Cook, Bjæverskov, Dänemark) aufgepumpt. Somit konnte das Gefäß verschlossen werden. Der Verschluss sowie die korrekte Lage des Ballons hinter dem ersten Diagonalast wurde mittels Kontrastmittelinjektion über den Judkins rechts-Katheter in die LAD verifiziert. Im Anschluss wurde der JR-Katheter

aus der LCA gezogen, um eine Beeinträchtigung des Blutstromes durch den linken Hauptstamm auszuschliessen. Der Ballon wurde für eine Zeit von 60 Minuten aufgepumpt in der LAD belassen.

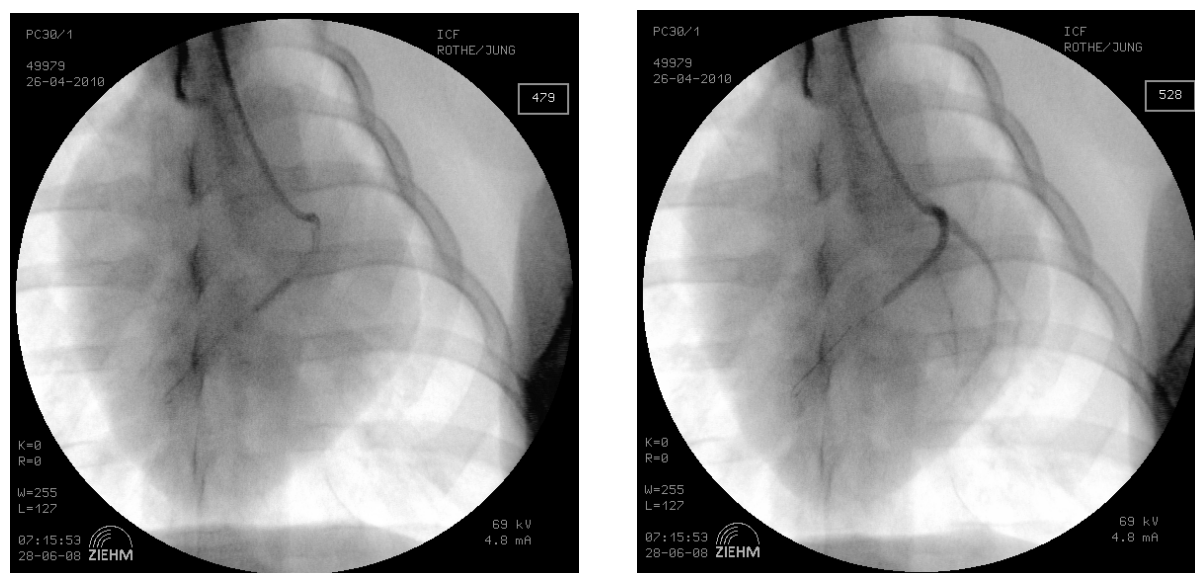
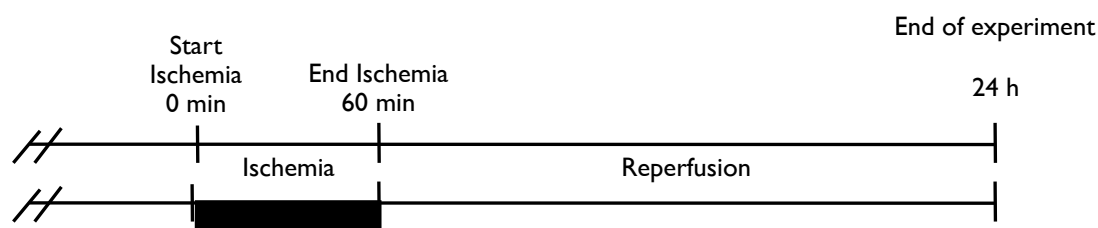


Abb.11: Infarktinduktion LAD distal 1. DA mittels PTCA-Ballonkatheter

2.2.6.1. Kontrolltiere

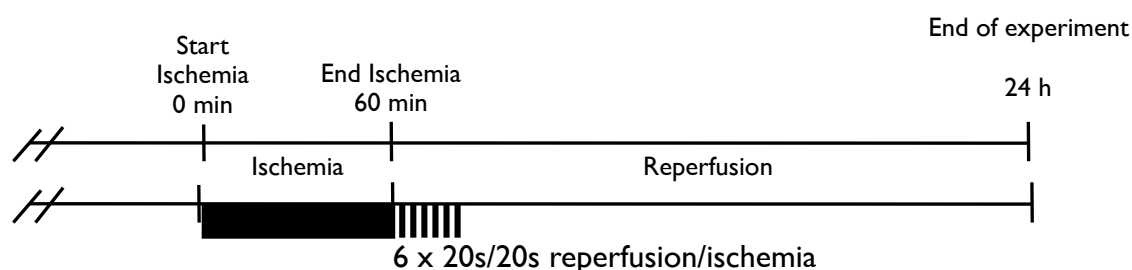
Die Kontrolltiere ($n=8$) erhielten im Anschluss an den Infarkt keine therapeutische Intervention. Die Durchgängigkeit der LAD wurde nach den 60 Minuten Ischämie mittels Kontrastmittelinjektion geprüft. Im Anschluss wurden die Schleusen entfernt, die Gefäße ligiert und die Inzisionsstelle mit Faszien- und Hautnaht (Suprolene 0 USP, 3,5 metric grün, nicht resorbierbar RESORBA) verschlossen. Nach Narkoseausleitung/Extubation und Überprüfung suffizienter Vitalparameter wurden die Tiere in die Ställe des Walter-Brendel-Instituts (WBex) gebracht.



Zeittafeln (siehe auch folgende) der experimentellen Abläufe modifiziert nach Vinten-Johansen et al, Am J Physiol Heart Circ Physiol 2003

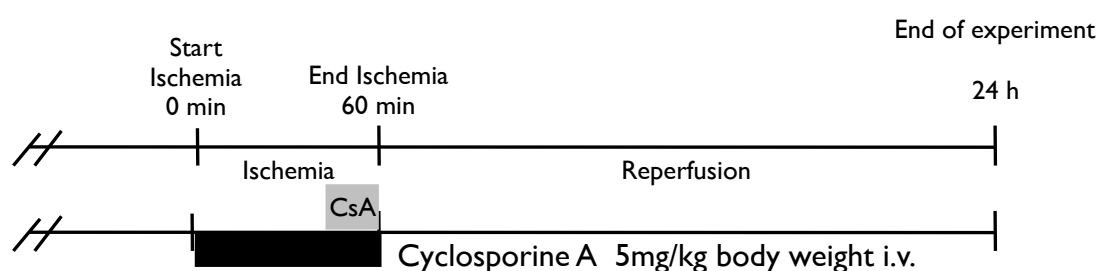
2.2.6.2. Ischämisches Postconditioning

Bei den Tieren ($n=10$) dieser Interventionsgruppe wurde im Anschluss an die Ischämiezeit von 60 min der Reperfluß durch wiederholtes Auf- und Abblasen des PTCA-Ballonkatheters (NC Ranger®, Boston Scientific Corporation, Natick, USA) staccato - artig unterbrochen. Die Anwendung kurzer Zyklen von Reperfusion/ Ischämie in der frühen Reperfußphase wird als Ischämisches Postconditioning verstanden. Das Protokoll für das Ischämische Postconditioning in dieser Versuchsreihe sah folgenden Zyklus vor: 6x 20s Ischämie/Reperfuß, jeweils im Wechsel. Im Anschluss wurde der Ballonkatheter aus der LAD entfernt, die Gefäße ligiert und wie in 2.2.6.1. weiter verfahren.



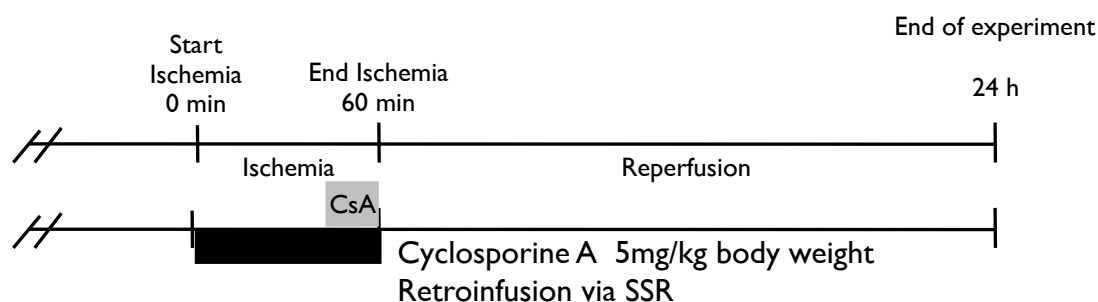
2.2.6.3. Ciclosporin A: systemische Applikation

Zehn Minuten vor Ende der Ischämie wurde in einer Versuchstiergruppe ($n=9$) Ciclosporin A (Sandimmun, Novartis Pharma) über die Ohrmandvene mit einer Konzentration von 5 mg/kg Körpergewicht i.v. infundiert. Hierzu wurde die Dosis auf 2 Perfusorspritzen verteilt und mit isotoner Kochsalzlösung (NaCl) 0,9% (B.Braun Melsungen AG, BRD) verdünnt. Die Infusion wurde zeitlich mit Abschluss der Ischämie beendet. Ciclosporin A sollte hierdurch vor Ende der Ischämie / zu Beginn der Reperfuß eine ausreichende Konzentration im Gefäßsystem vorhanden sein. Nach Applikation wurden die Tiere für 60 weitere Minuten intraoperativ beobachtet, Blutabnahmen durchgeführt und erst im Anschluss wie in 3.2.6.1. weiterverfahren.



2.2.6.4. Ciclosporin A: Retroinfusion

Zehn Minuten vor Ende der Ischämie wurde einer weiteren Versuchstiergruppe Ciclosporin A (Sandimmun, Novartis) mittels Retroinfusion (**n=8**) durch einen SSR-Katheter (selective suction and retroinfusion) in die AIV (= anteriore interventrikuläre Vene) appliziert (siehe Abb. 14). Wie in der Gruppe mit i.v.-Applikation von Ciclosporin A betrug die Konzentration 5 mg/kg Körpergewicht. Die Infusion wurde ebenfalls zum Abschluss der Ischämie beendet.



2.2.7. Selektive Absaugung und Retroinfusion, Funktionsprinzip der SSR

Das System der „selective suction and retroinfusion“ (=SSR), also selektive Absaugung und Retroinfusion von Koronarvenen, wurde unter anderem für Hochrisiko-PTCA's als myokardprotektives perkutanes Herzkatheter-Verfahren angewendet [146-148]. In dieser experimentellen Reihe wurde zur lokalen Applikation von Ciclosporin A in die anteriore inferiore Herzvene die kontinuierliche, Druck-regulierte Retroinfusion gewählt, die ebenfalls mit dem System der SSR möglich ist. Diese stellt eine Abwandlung der selektiven Absaugung und Retroinfusion nach Boekstegers et al. dar. Hierbei wird auf das Zufügen arteriellen Blutes sowie der selektiven Absaugung, zu Gunsten der lokalen Konzentrationssteigerung des Medikaments, verzichtet. Ursprünglich besteht das System der selektiven druckregulierten Retroinfusion und Absaugung aus einem:

- a) Extrakorporalkreislauf mit Rollerpumpe und Hochdruckreservoir, dessen Ausfluss mittels einem Exzenter-Ventil reguliert werden kann,
- b) einer Absaugeinheit,
- c) einem Druckaufnehmer für die Druckbestimmung in der AIV,
- d) sowie einer EKG-triggerbaren Steuerung.

Hinzu kommt ein vier-lumiger 7,8F SSR-Katheter (Spezial Pulmonalis Katheter 7F, 4 Lumen, 60 bzw. 100 cm, MediSyst®, Rheinstetten, Deutschland). Wie oben erwähnt, fanden die arterielle Retroinfusion und die selektive Absaugung in diesem Experiment nicht statt. Das Hochdruckreservoir wurde stattdessen mit Natriumchlorid-Lösung gefüllt. Der Druck im Hochdruckreservoir steuert die Rollerpumpe. Dessen Vordruck ist dabei frei wählbar, wobei für diese Experimente ein Vordruck von 1250 mbar gewählt wurde. Um zu hohe und damit schädliche Drücke im koronarvenösen System zu vermeiden, enthält das SSR-System eine Druckregulierung, die den Druck im koronarvenösen System/ AIV misst. Der Druck, der mit der Retroinfusion im koronarvenösen System erzeugt wird, kann mittels der Exzenterklappe gesteuert, bzw. mittels Einstellung am System, angepasst werden. Zur Flussmessung der Infusion befindet sich vor der Exzenterklappe an der Retroinfusionsleitung eine Transsonic Flow-Probe-Sonde (Transonic© Flowprobe, Transonic Systems Inc., Ithaca, USA). Die vier Lumina des 7,8 F Katheters werden normalerweise wie folgt belegt:

- 1) Druckabnehmer, zur Messung und Regulierung des koronarvenösen Drucks vor und während der druckkontrollierten Retroinfusion in der AIV
- 2) Hochdruckreservoir, Infusion von Ciclosporin A, sowie Natriumchlorid-Lösung als Träger
- 3) Absaugung (hier nicht benutzt)
- 4) Ballon des SSR Katheters

Der Pumpvorgang der SSR kann EKG getriggert werden. Hierbei wird mit kutanen Klebelektroden das Signal abgeleitet und im System die Pumpfunktion angepasst. Das System lässt sich EKG getriggert im 1:1 1:2, 1:3, 1:4 und 1:8-Modus (Pumpaktion : Herzschlag) anwählen. Zudem ist die Latenzzeit zwischen R-Zacke und Pumpaktion des SSR-Systems frei wählbar, sodass die Retroinfusion auf die Dauer der Diastole gezielt appliziert werden kann. Im hier beschriebenen Versuch war die Pumpaktion vom EKG Signal losgelöst, das System auf autonom eingestellt

[143, 145-147, 149-156].

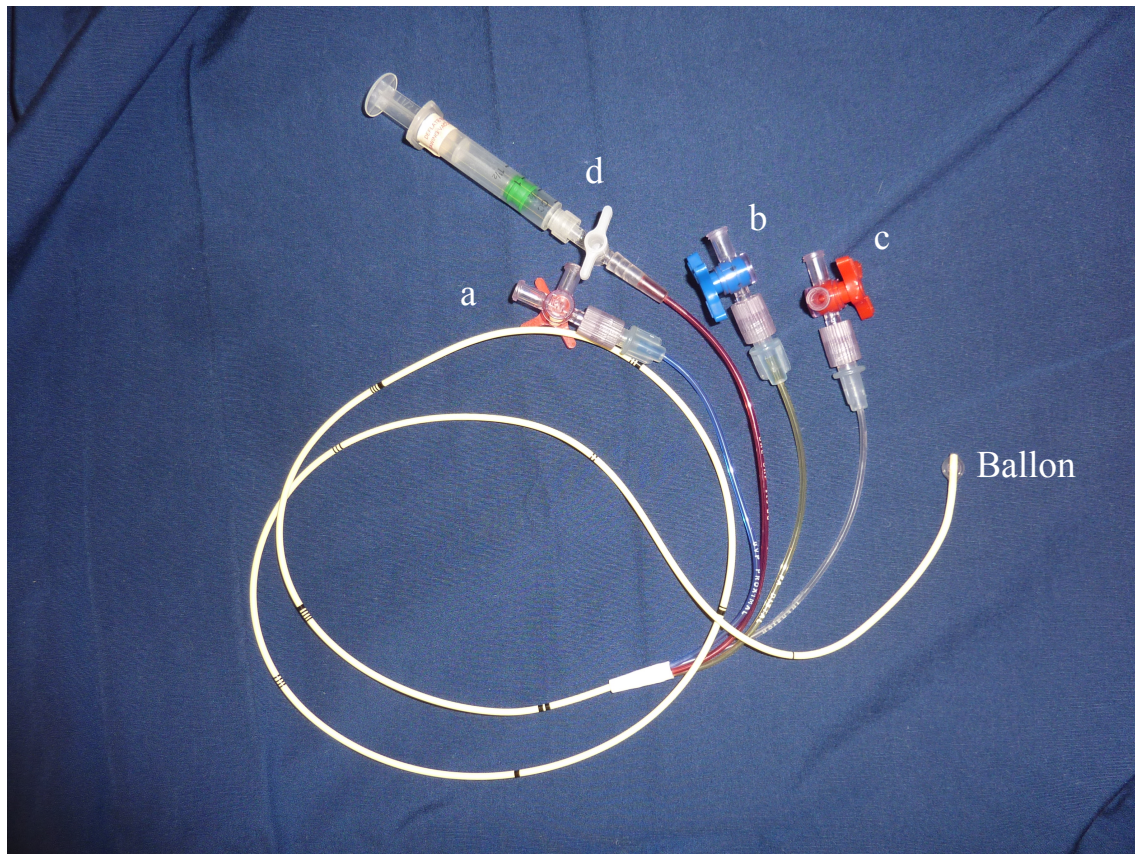


Abb. 12: 4-lumiger - SSR-Katheter, (Spezial Pulmonalis Katheter 7F, 4 Lumen, 60 bzw. 100 cm, MediSyst®, Rheinstetten, Deutschland). Belegung der Lumina: a) Druckabnehmer, b) Hochdruckreservoir - Infusat, c) Absaugung, d) Balloninflator

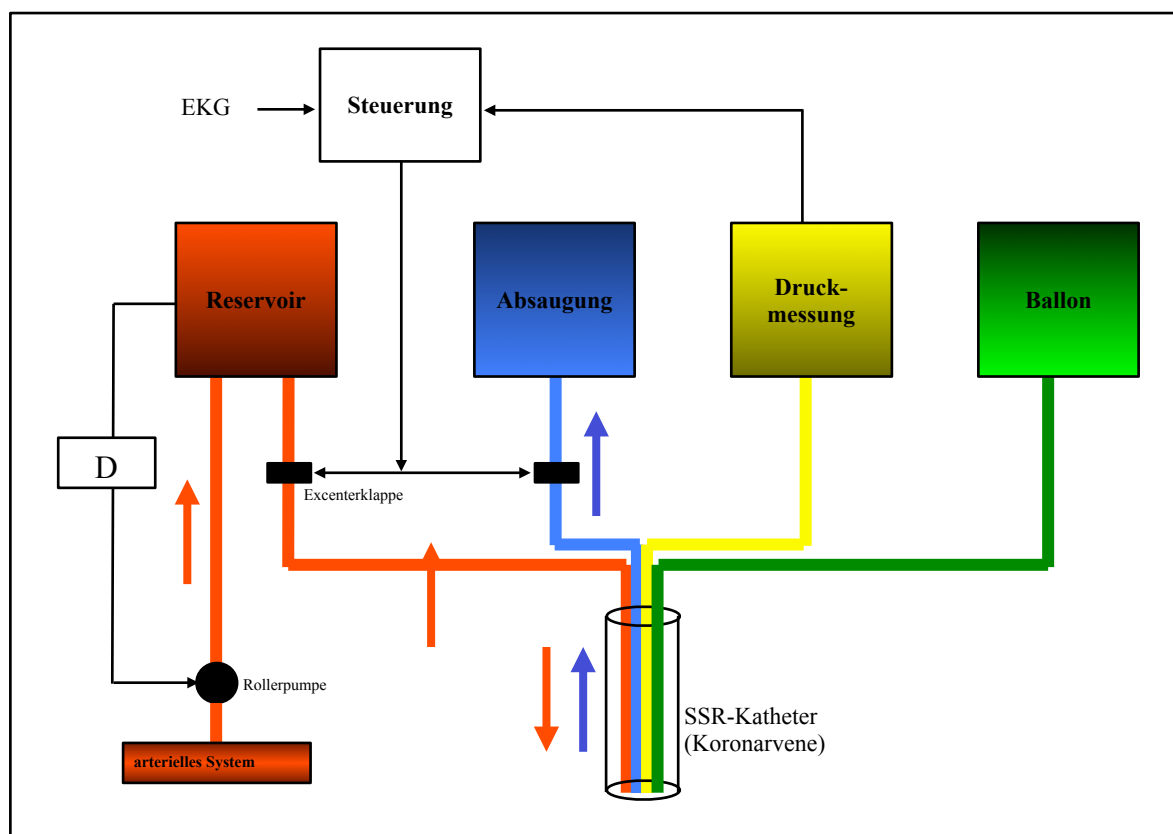


Abb. 13: Aufbau der selektiven synchronisierten Absaugung und druckregulierten Retroinfusion von Koronarvenen (SSR) (Schematische Darstellung); Pfeile symbolisieren die Flussrichtung des Retroinfusates (rot) und des aus der Koronarvene abgesaugten Blutes (blau). Entnommen aus Dissertation Philipp Raake 2003

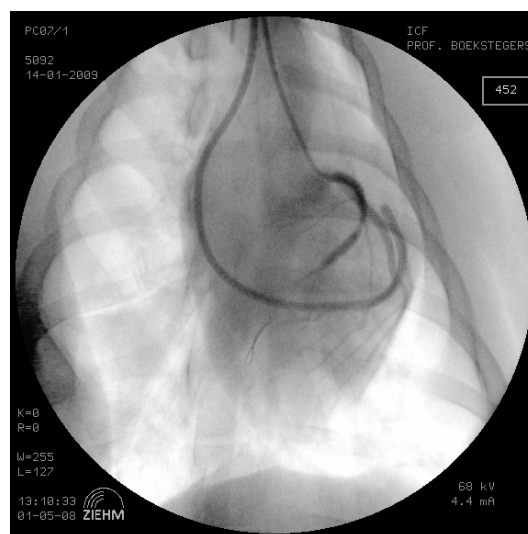
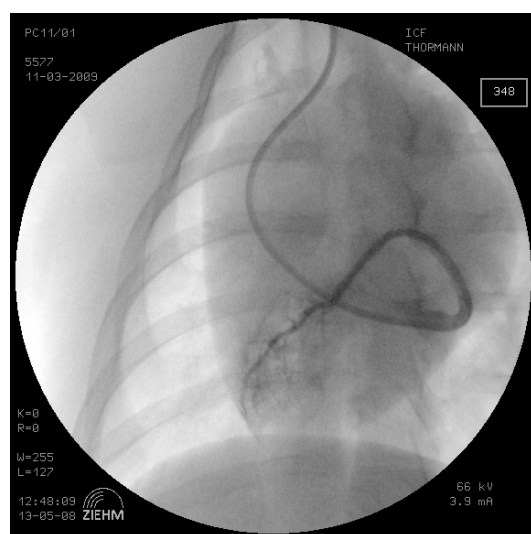


Abb. 14: Darstellung der AIV / Balloninflation in LAD und gleichzeitige Sondierung der AIV. Links: AIV, rechts: Infarktinduktion

2.2.8. Retrograde Applikation von Ciclosporin A

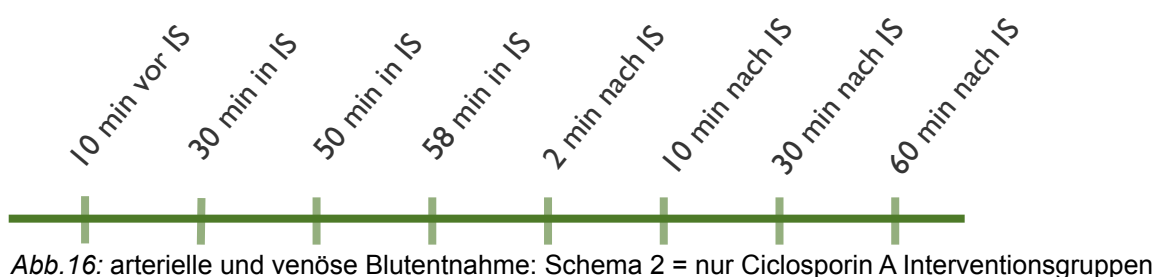
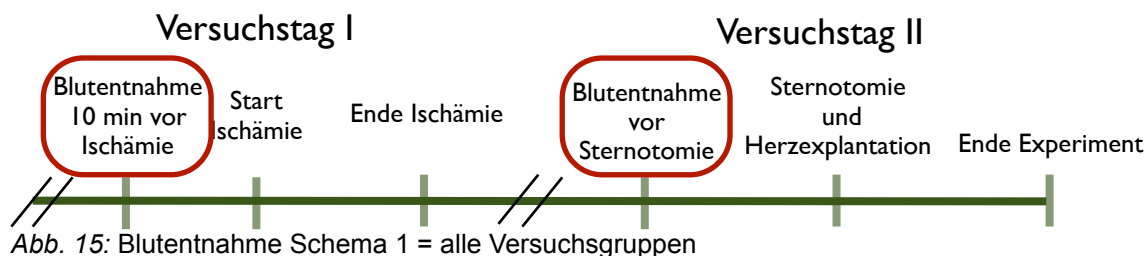
Über die in der Vena jugularis liegende 11Fr Schleuse wurde vor Beginn der Ischämie der SSR Katheter in die AIV eingeführt. Zunächst erfolgte das Platzieren eines 7Fr Cournand Katheter (Cordis® Cournand 7F, 2 Sideholes, Cordis Corporation, Miami, FL, USA Miami) über den rechten Vorhof in die Vena cordis magna. Mittels einem 0.018 I Führungsdraht (Road Runner Extra Support, Cook, Bjaeverkopv, Dänemark oder Shinobi® Plus Steerable Guidewire, 18 inch, 180 cm, Cordis Corporation, Miami, FL, USA) wurde dann die anteriore inferiore Herzvene sondiert. Der Cournand-Katheter wurde dann gegen den Retroinfusionskatheter (Spezial Pulmonalis Katheter 7F, 4 Lumen, 60 bzw. 100 cm, MediSyst®, Rheinstetten, Deutschland) ausgetauscht. Dabei wurde der Ballon des SSR Katheters in Höhe des Abgangs des ersten Diagonalasts der LAD platziert. Der SSR Katheter wurde als nächstes mit dem SSR-Gerät (PTC Myoprotect® SSR, Pro-Med Technology Consult medizinisch-technische Geräte GmbH, Mödling, Österreich) verbunden. Das System der SSR wurde wie folgt eingestellt: Der Pumpmodus wurde auf autonom, also nicht EKG-getriggert gestellt. Das Absaugemodul wurde ausgeschaltet, der Druck im Hochdruckreservoir auf 1250 mbar eingestellt. Die Lumina des SSR Katheters waren dementsprechend nur mit dem Hochdruckreservoir (NaCl, 0.9% B Braun Melsungen), dem Balloninflator und dem Druckaufnehmer belegt. Das vierte Lumen wurde somit nicht genutzt. Nach Balloninflation des SSR-Katheters wurde der individuelle systolische Verschlussdruck des koronarvenösen Systems gemessen und der Retroinfusions-Druck um 20 mmHg höher als der systolische Verschlussdruck gewählt. Dies soll eventuelle Druckschäden am venösen System durch Über- oder Unterperfusion vermeiden. Bis zum Infusionsbeginn von Ciclosporin A wurden die Lumina des SSR-Katheters mit Natriumchlorid-Lösung gespült. Ciclosporin A wurde in einer Konzentration von 5mg/kg Körpergewicht bereitgestellt und anschließend auf 30ml mit Natriumchlorid-Lösung gelöst, sowie auf 2 Perfusorspritzen à 15ml verteilt. Die Perfusorspritzen wurden an den Perfusor angeschlossen, sowie mit einem 3-Wege-Hahn-System an das Lumen des SSR Katheters mit Kontakt zum Hochdruckreservoir angeschlossen. Zehn Minuten vor Ende der Ischämie erfolgte dann die Infusion von Ciclosporin A durch den SSR Katheter in das LAD drainierende venöse Gebiet für den Zeitraum von 10 Minuten. Hierzu wurde der Ballon an der Spitze des SSR-Katheters mit 150mmHg geblockt und die druckregulierte Retroinfusion, sowie die Perfusoren

(Geschwindigkeit = 99ml/h) gestartet. Die Infusion wurde mit Abschluss der Ischämie beendet. Am Versuchsende (sowohl bei den Kontrolltieren, als auch in den Interventionsgruppen) wurden die Katheterschleusen entfernt (in Retroinfusionsgruppe 1 Stunde nach Infarkt), die A. carotis communis und V. jugularis externa vernäht (Ethicon® Perma - Hand Seide 1.4 Ph. Eur.)schwarz, geflochten, nicht resorbierbar Johnson - Johnson Intl.) und die Wunde schichtweise subkutan und intrakutan verschlossen (Suprolene 0 USP (3,5 metric) grün, nicht resorbierbar, Resorba). Im Anschluss folgte die Ausleitung der Narkose. Sobald die Tiere eigenständige Atmung vorweisen konnten, sowie die Tiere stabile Vitalparameter vorweisen konnten, wurden sie extubiert und zurück in den Tierstall verlegt.

2.2.9. Blutproben

Es wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Experimente arterielle und venöse Blutproben aus den jeweiligen Schleusen entnommen. Diese wurden in Serum- und EDTA-Röhrchen asserviert. Alle Serumproben wurden nach 20 Minuten bei 1400 Umdrehungen/min und 4 Grad Celsius zentrifugiert. Der Überwurf (=Serum) wurde anschließend in kleine Eppendorf Tubes pipettiert und bei -80 Grad Celsius im Kühlschrank gelagert. In allen Gruppen erfolgten Blutentnahmen am ersten OP-Tag 10 Minuten vor der Ischämie und am zweiten Versuchstag vor der medianen Sternotomie. (Abb.9). Aus diesen Proben wurden später in der klinischen Chemie des Klinikums Großhadern die Gesamt-CK, Troponin I, LDH, AST, ALT, (NO, HDL, LDL, Cholesterin, Elektrolyte) gemessen. In den Ciclosporin A -Interventionsgruppen erfolgten zusätzliche arterielle und venöse Blutentnahmen vor, während und nach dem Infarkt (siehe Schema 2, Abb.8), um die jeweiligen Konzentrationen Ciclosporin A im zeitlichen Verlauf im Gefäßsystem messen zu können (CsA i.v. arteriell: n=5 / venös: n=6; CsA Retroinfusion arteriell: n=7 / venös: n=6). Hierfür wurden EDTA-Blutproben benutzt. In der Therapiegruppe Retroinfusion wurden die venösen Proben am Versuchstag 1 über den SSR-Katheter aus der AIV entnommen. Hierzu wurde der SSR-Ballon für höchstens 30 Sekunden geöffnet, um ein Entweichen von Ciclosporin A aus dem koronarvenösen System weitestgehend zu vermeiden. Zusätzlich zu den Blutentnahmen der hier beschriebenen Tierversuche (24h) wurden auch Blutentnahmen bei Kurzversuchen durchgeführt. Hierbei wurde das

experimentelle setting im Bezug auf die Messungen von Ciclosporin A im Blut nicht beeinflusst.



2.3. Versuchstag 2

2.3.1. Wiederholung der Schritte 2.2.1. - 2.2.6.

Das unter 2.2.1 - 2.2.6. erwähnte Prozedere wurde wiederholt. Hierzu gehörten Erhebung der Ejektionsfraktion (baseline, pacing), LVEDP, LVdevP, dp/dt.

Für die anschließenden subendokardialen sonomikrometrischen Messungen wurden der rechtsatriale Pacer, als auch der Conductance-Katheter zur Druckregistrierung in situ belassen.

2.3.2. Sternotomie

Nach den parallel zu Versuchstag 1 durchgeführten Messungen wurde eine mediane Sternotomie durchgeführt. Die Hautinzision erfolgte zwei cm unterhalb des Jugulums bis kurz unterhalb des Xiphoids. Es folgte die Inzision der Haut, des Subkutangewebes, sowie der Muskulatur herunter bis auf das Sternum. Blutstillung wurde mittels Elektrokauter erreicht. Unterhalb des Xiphoids wurde dann stumpf ein Tunnel hinein ins Abdomen präpariert. Anschließend wurde mit den Fingern das Zwerchfell stumpf nach kranial durchbohrt. Das Sternum wurde nun mit einer

Knochenschere von kaudal nach kranial durchtrennt und das Mediastinum eröffnet. Mittels Rippenspreizer wurden die Thoraxhälften auseinander gehalten.

2.3.3. Sonomikrometrie: Regionale Myokardfunktion

Die Sonomikrometrie ist eine Methode zur Messung der regionalen kontraktile Funktion des Myokards in vivo. In diesem Modell sollte untersucht werden, wie sich die unterschiedlichen Therapieformen auf die Kontraktilität des Myokards auswirken. Hierbei werden zwei piezoelektrische Ultraschallkristalle in jeweils gleicher Tiefe der Muskelschicht, parallel zur Faserrichtung, sowie entlang der kurzen Herzachse, eingesetzt [157-159]. Somit befinden sich die Kristalle entlang der maximalen Myokardkontraktion. Im hier dargestellten Modell wurden die Kristalle subendokardial, in einem Abstand von 10-15 mm eingesetzt. Das Kristallpaar (jeweils 2mm im Durchmesser) besteht aus einem Transmitter und einem Receiver, wobei das Signal mit 5 MHz ausgesendet wird [144]. Das Signal wird an ein Ultraschallentfernungsmessgerät (Sonicrometer, Triton Technology Inc., San Diego, USA) weitergeleitet. Ein Computer (Pentium 200MHz, HSE, March-Hugstetten, BRD) misst darauf den Abstand der Kristalle mittels folgender Formel:

Formel 1: $s = v \cdot t$

s = Abstand der beiden Kristalle; v = Schallausbreitungsgeschwindigkeit im Myokardgewebe; t = Laufzeit des Ultraschallsignals

Die Schallausbreitungsgeschwindigkeit zwischen den Kristallen ist im Herzmuskel mit der in NaCl mit ca. 1500 m/sec nahezu identisch und wird daher formell gleichgesetzt. Nach Bugge-Aspersheim stellen lokale Temperaturunterschiede im Myokard während der Herzaktion keinen Störfaktor der Ausbreitungsgeschwindigkeit dar. Somit kann eine direkte Proportionalität zwischen der Transmission des Signals und der Distanz zwischen den Kristallen angenommen werden [158]. Nach Platzierung der Kristalle ist der Messfehler bei einer Abweichung von der optimalen Messachse von bis zu 30° vernachlässigbar gering. Die regionale Kontraktion wird als Segmentverkürzung in Prozent der enddiastolischen Länge angegeben.

Formel 2:

$$SS[\%] = (EDL - ESL) \cdot 100 / EDL$$

SS = Segmentverkürzung (segment shortening),

EDL = Enddiastolische Länge,

ESL = Endsystolische Länge

Im hier vorgestellten Modell wurde die regionale Kontraktilität/Segmentverkürzung an drei verschiedenen Orten gemessen.

a) LAD proximal = ca. 10 mm distal des Abgangs des ersten Diagonalasts der LAD (AAR).

b) LAD distal = ca. 30 mm distal des Abgangs des ersten Diagonalasts der LAD (Infarktareal)

c) RCX = ca. 1-2 cm orthogonal der RCX (Kontrollareal)

Dazu wurde zunächst eine mediane Sternotomie durchgeführt, sowie der Herzbeutel eröffnet, sodass das Herz frei schlagen konnte. Mittels Skalpell (Disposable Scalpel No. 11, Feather Safety Razor Co., Japan) wurden das Myokard an den besagten Stellen inzidiert. Die Inzision wurde stumpf mit einem Overhold erweitert und die Kristalle bis zum federnden Widerstand des Endokards in die Perforationen eingeführt (siehe Abb. 17 und 18). Die korrekte Lage der Kristalle wurde postmortem überprüft. Hierzu diente auch die Färbung des ischämischen Bereichs mittels TTC, welches die AAR identifizierte. Es wurden Messungen sowohl in Ruhe, als auch bei rechtsatrialem Pacing bei 80/min, 100/min, 120/min, 140/min, 150/min und falls möglich bei 180/min durchgeführt. Die Kristallpaare wurden jeweils einzeln für die jeweilige Region gesetzt, sodass das Herz insgesamt drei mal rechtsatrialem Pacing bis zu einer Frequenz von mindestens 150/min ausgesetzt war. Die Kristallpaare einzeln für die jeweilige Bereiche einzusetzen beruht auf vorherigen Versuchen insgesamt drei Kristallpaare zu implantieren. Hierbei kam es jedoch zu Interferenzen der Signale und somit zur unmöglichen Auswertung der Myokardkontraktilität. Die Abstände der Ultraschallkristalle wurden über ein Abstandsmessgerät (Sonomicrometer, Triton Technology Inc., San Diego, USA) zusammen mit dem linksventrikulärem Druck sowie EKG und dP/dt kontinuierlich aufgezeichnet und gespeichert (Sonomicrometrics; SonoLab Leycom Sigma-5DF, Cardiodynamics, Zoetermeer, Niederlande; Rechner Pentium II 200MHz, HSE, March-Hugstetten, BRD). Zur Auswertung wurden 4 Messzeitpunkte ausgewählt und die EDL

(enddiastolische Länge) und ESL (endsystolische Länge) bestimmt und nach Formel 2 die regionale Segmentverkürzung (segment shortening = ss) berechnet.

Zur Festlegung der Messzeitpunkte:

- a) EDL: Die Enddiastolische Länge wurde im Computerprogramm definiert als der Beginn des Aufwärtstrends des linksventrikulären dP/dt ,^[144]
- b) ESL: Die endsystolische Länge der Myokardfasern wurde im Computerprogramm definiert als der Zeitpunkt 20ms bevor dem maximal negativen dP/dt .^[144]

Insgesamt wurden zur Auswertung 4 aufeinander folgende Messzeitpunkte gewählt , aus denen der Mittelwert bestimmt wurde.

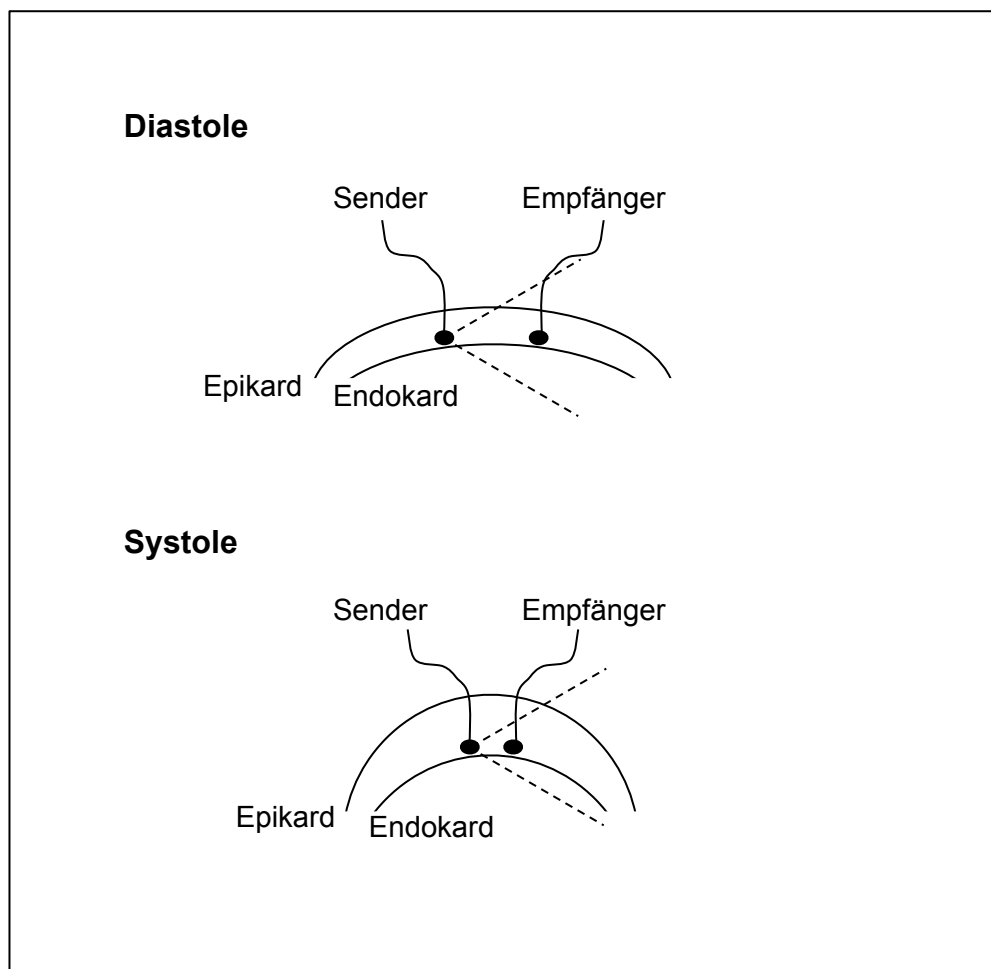


Abb. 17: Schematische Darstellung der piezoelektrischen Kristalle im Myokard, Abbildung entnommen aus Dissertation Philipp Raake 2003

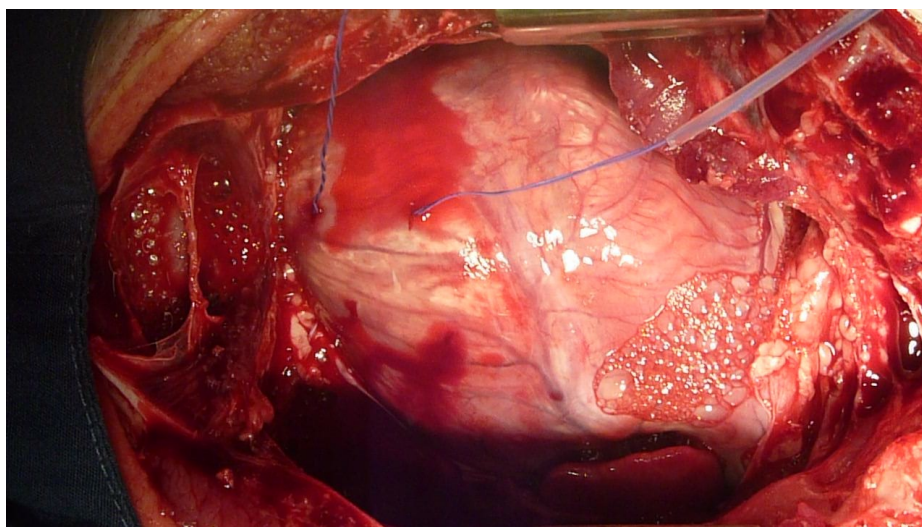


Abb. 18: Darstellung der piezoelektrischen Kristalle zur Messung der regionalen Myokardkontraktilität (Sonomikrometrie - Segmentverkürzung). Z.n. Sternotomie.

2.3.4. Färbung, Explantation, Gewebeasservation, Infarktgrößenauswertung

Nach Abschluss der sonomikrometrischen Messungen wurde die LAD hinter dem ersten Diagonalast mittels Supilene-Durchstechung/Ligatur vom Blutfluß abgebunden. Dadurch wurde ein Eindringen der anschließend applizierten Methylenblaufärbung in den ischämischen Bereich, sowie in die „area at risk“ verhindert. Die Gasnarkose mit Isofluran wurde nun auf 5 % erhöht, sodass eine ausreichende Narkostiefe für die anschließende Explantation des Herzens gewährleistet wurde. Die elektromechanische Entkopplung des Herzens (Kardioplegie) erfolgte mittels intraventrikulärer Injektion von 10ml 5% gesättigter Kaliumchlorid-Lösung. Nach Durchführung der Kardioplegie wurden 15 ml 10% Methylenblau, ebenfalls intraventrikulär, zur Färbung des nichtischämischen Areals des linken Ventrikels injiziert. Methylenblau kann sich, nachdem die LAD hinter dem 1.DA abgebunden wurde, nur im Bereich der rechten Koronararterie und dem Bereich des Versorgungsgebietes des Ramus circumflexus anreichern. Die Verteilung von Methylenblau in der kardioplegen Phase wurde durch manuelle Kompression des Herzens gewährleistet. Im Anschluss erfolgte die Herzexpplantation mit Durchtrennung der A. pulmonalis, Aorta und der Lungenvenen. Nach Sondieren der LAD erfolgte nun die Injektion von TTC (Triphenyltetrazoliumchlorid, 150 mg TTC, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland, aufgelöst in 10 ml PBS)

hinter den Abgang des ersten Diagonalasts. Als zunächst farbloser, wasserlöslicher Redox-Indikator dient TTC der Vitalfärbung von Gewebe. Mittels TTC färben sich die noch vitalen Zellen im Ischämieareal und in der „area at risk“ anhand einer Redoxreaktion der Pyruvatdehydrogenase rot. Nekrotische Areale können somit von vitalen Bereichen visuell unterschieden werden (siehe Abb. 20). Bei dieser Reaktion wird 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid über ein Tetrazolium-Radikal, durch Aufnahme von zwei Elektronen und einem Proton, zu dem roten Farbstoff 1,3,5-Triphenylformazan reduziert:

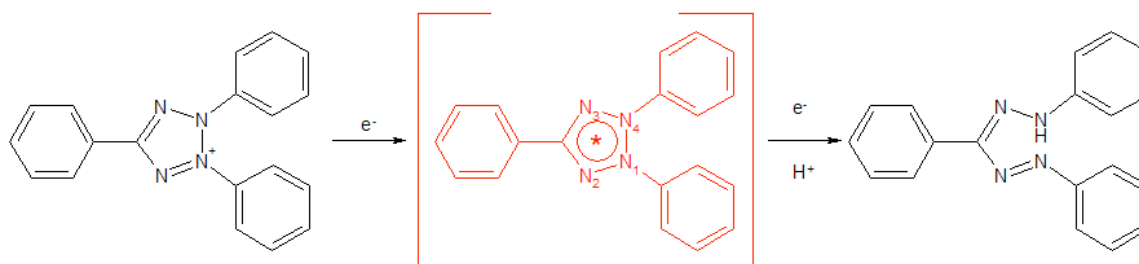


Abb. 19: Reduktion von TTC zu Triphenylformazan

TTC lässt also ischämische Areale ungefärbt. Nekrotische Areale können somit vom Rest unterschieden werden. Zusätzlich wurde die rechte Koronararterie sondiert und weitere 10 ml Methylenblau in den nichtischämischen Bereich injiziert. Methylenblau dient somit als Ausschlussfärbung (siehe Abb. 21). Nach der letzten Injektion wurde das Herz mittels eines Parenchymmessers von der Basis bis zur atrioventrikulären Ebene orthogonal zur LAD in 5 Slices (Schnitte) geschnitten. Anschließend wurden diese zur Infarktgrößenauswertung fotografiert.

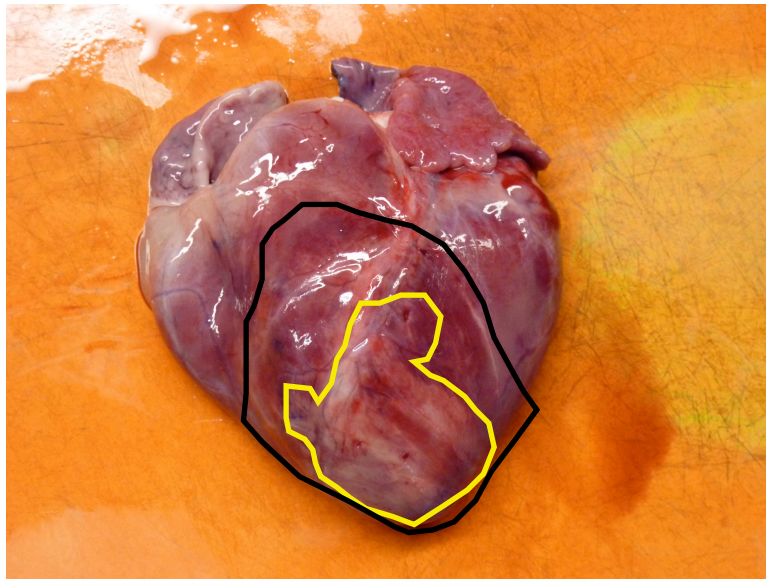


Abb.20 Darstellung des Ischämiareals/AAR mit TTC. Schwarz: AAR; gelb: Infarkt

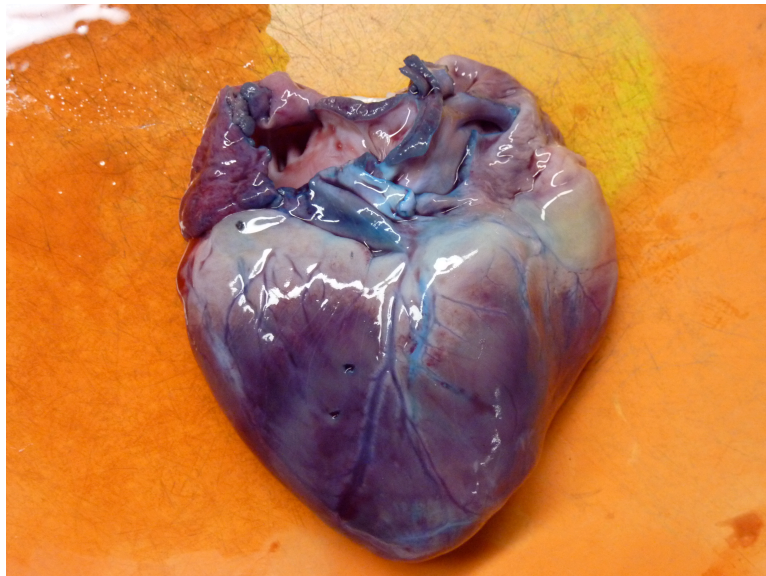


Abb.21: Darstellung des nichtischämischen Areals mittels Methylenblau

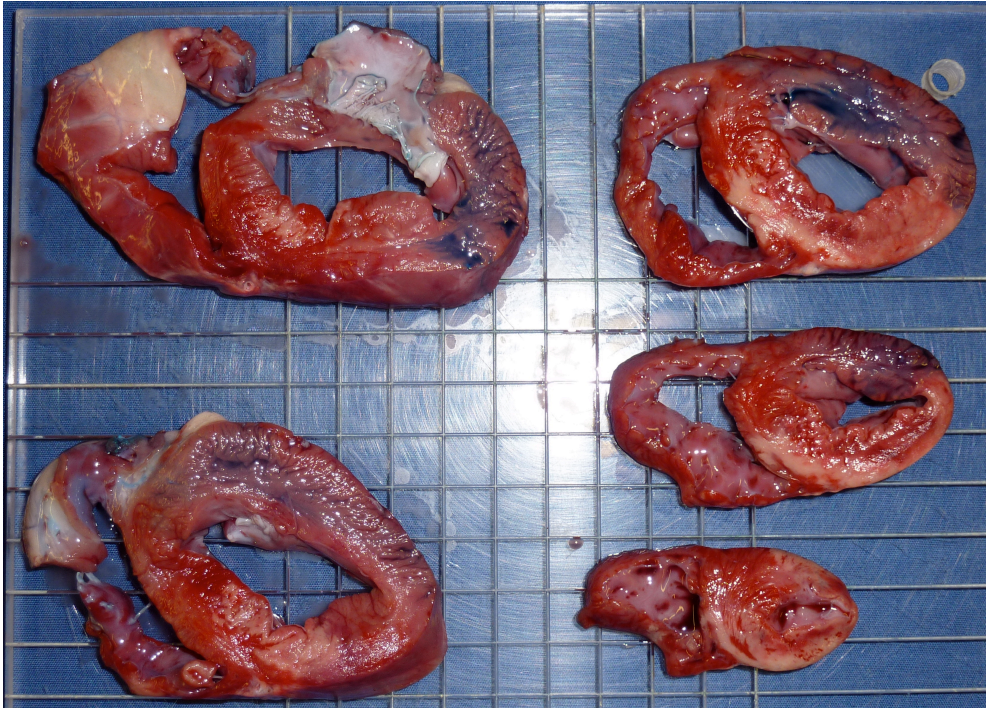


Abb. 22: Slices nach Färbung

Für weitere Auswertungen wurden aus jedem Bereich (Inf/AAR/RCX) in jedem Slice Proben entnommen, in Trockeneis oder flüssigem Stickstoff schockgefroren und später bei -80 Grad Celsius im Kühlschrank aufbewahrt. Die Infarktgrößenauswertung erfolgte mit dem PC-Programm Image J (NIH, Bethesda, Maryland, USA). Hierbei wurden Lumen, linker Ventrikel, „area at risk“ und Infarktareal manuell ausgemessen und miteinander in Beziehung gesetzt:

- Infarkt in % vom linken Ventrikel (Inf%LV)
- Infarkt in % von der area at risk (Inf%AAR)
- area at risk % linker Ventrikel (AAR%LV)

2.4. Myeloperoxidase-Messung zum Nachweis von Neutrophilen Granulozyten

Die Myeloperoxidase ist ein Enzym, welches hauptsächlich in Neutrophilen Granulozyten (Polymorph Neutrophils = PMN) zu finden ist. Durch die photometrische Messung der Quantität an Myeloperoxidaseaktivität in einer Probe kann durch spezifische Standardkurven auf die Quantität von Neutrophilen

Granulozyten in einer Probe rückgeschlossen werden^[153]. Für die photometrischen Extinktionsmessungen zur Bestimmung der MPO-Aktivität wurden Myokardproben aus den Slices zwei und drei, der jeweiligen Regionen RCX/AAR/LAD abgeschlagen und ca. 150 mg davon abgewogen. Anschließend wurden die jeweiligen Proben in je 3 ml 50mM Phosphatpuffer (pH 6,0) und HTAB (Hexadecyltrimethylammonium bromid) gegeben, um sie anschließend zu ultraturraxen. Nach 10 Sekunden im Ultraschallbad wurden die Proben jeweils drei mal bei -80 Grad Celsius eingefroren und bei Raumtemperatur wieder aufgetaut, um danach wieder 10 sek im Ultraschallbad zu verweilen. Anschließend wurden die Proben 30 min bei 40.000g (UZ Beckmann; TI 70-Rotor; 21,200 rpm) und 15 Grad Celsius zentrifugiert. 100µl des Überstands des Zentrifugats wurden nun in Makroküvetten eingesetzt. Zuvor wurden in den Überständen die jeweiligen Proteinkonzentrationen in mg/ml (Proteinmessung nach Pierce) bestimmt. Bevor die MPO in den einzelnen Proben gemessen werden konnte, wurde zunächst der Leerwert als Referenz gemessen. Hierzu wurden 2,9ml 50mM Phosphatpuffers (pH 6,0) + 0,53mM O-Dianisidin (MG 317,2) + 100µl des Überstands der Probe in die Makroküvetten pipettiert. Anschließend wurden die Leerwerte im Photometer per Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von $\lambda=460$ nm bestimmt. Zur Messung der MPO in den einzelnen Proben wurden die 100µl Überstand des jeweiligen Zentrifugats mit 2,9 ml 50mM Phosphatpuffer (pH6,0) + 0,53 mM O-Dianisidin + 0,15mM H_2O_2 zusammen in Makroküvetten pipettiert. H_2O_2 setzt Myeloperoxidase aus den Neutrophilen Granulozyten frei. Mit diesen Proben wurden wiederum bei einer Wellenlänge von $\lambda=460$ nm im Photometer Extinktionsmessungen durchgeführt. Die Messungen wurden nach 20 Minuten nach Reaktionsbeginn von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) mit den Neutrophilen Granulozyten begonnen, da nach 20 Minuten das Maximum der Freisetzungsreaktion der MPO aus den Granulozyten vorliegt. Aus den Werten der Extinktion der Myeloperoxidase von Leerprobe und Versuchsproben konnte mittels einer Standardkurve die im Gewebe sich befindende Menge an Neutrophilen Granulozyten berechnet werden.

2.5. RISK-pathway Western Blots

Der RISK-pathway (Reperfusion injury salvage kinase), eine Signalkaskade von hintereinandergeschalteten Kinasen, die nach Ischämie in der Phase der

Reperfusion initiiert wird ^[160], wurde bereits in tierexperimentellen Versuchen beschrieben, wobei die Rolle des RISK-pathways im Schweinemodell noch kontrovers diskutiert wird ^[99, 112, 113]. Zu den RISK-Kinasen gehören AKT, ERK1/2, GSK3 β und p70S6K. Diese können in dephosphorylierter oder phosphorylierter Form vorliegen. In unseren Versuchen wurden für die Kontrollgruppe (n=4) und für die interventionelle Gruppe Ischämisches Postconditioning (n=5) Western Blots zum Proteinnachweis von AKT1/pAKT1, GSK3 β /pGSK3 β und ERK(1/2)/pERK(1/2), sowie Actin als Kontrolle durchgeführt. Hierzu wurden von den jeweiligen Tieren Myokardproben der Area at risk, entnommen und anschliessend der Proteinnachweis mittels Western Blot durchgeführt. Als interne Kontrolle des Westernblots galt das Protein Actin. Hierzu wurde nach ersten Laufen des Blots dieser mit Stripping Puffer (Restore™ Western Blot Stripping Buffer, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) gestrippt. Die Membran wurde mit den spezifischen Proteinen (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; Cell Signaling) als primärer Antikörper inkubiert (Proteine siehe Liste im Anhang). Als sekundärer Antikörper wurde Donkey-Anti-Goat IgG HRP (Santa Cruz S2020, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) benutzt. Die Filmentwicklung erfolgte im Entwickler (Cerox 60, AGFA HealthCare, Köln, BRD) mit CL-XPosure™-Film (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Die Bandendicke wurde mit dem Geldokumentationssystem Gel Doc 2000 (Gel Doc 2000, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) und dem Programm Quantity One 4.1.1 bestimmt. Im Anschluss wurde das Verhältnis der dephosphorylierten zur phosphorylierten Form des jeweiligen Proteins, sowie das Verhältnis phosphoryliertes Protein zu Actin errechnet.

2.6. Liquid Chromatography Tandem Massenspektrometrie (LC-Tandem MS) zum Nachweis von intramyokardialen CsA-Konzentrationen

Die intramyokardialen CsA Konzentrationen wurden mittels Tandem Liquid Chromatography Mass Spectrometry in den Myokardproben bestimmt. Die Untersuchungen erfolgten im Institut für klinische Chemie des Klinikums Grosshaderns in Zusammenarbeit mit Prof. Vogeser und Dr. Sarper. Die Versuche dienten zum Nachweis der erhöhten intramyokardialen CsA Konzentration nach Retroinfusion im Vergleich zur systemischen CsA-Applikation. Hierzu wurden aus jeder therapeutischen Gruppe (CsA systemisch und CsA Retroinfusion), jeweils n=6

Tiere zur weiteren Diagnostik ausgewählt. In der Gruppe der systemischen Applikation von CsA wurde die CsA Konzentration der Slices 1 und 4 jeweils der Bereiche AAR und LAD gemessen (AAR 1+4; LAD 1+4). In der Gruppe der CsA-Retroinfusion wurden jeweils Myokardproben der Slices 1 und 4 der Bereiche RCX, AAR und LAD (RCX1+4, AAR1+4, LAD1+4) untersucht. Die Proben wurden hierzu zunächst von -80 Grad Celsius auf Raumtemperatur gebracht, das Gewebe mittels Western Blot Puffer lysiert und homogenisiert und die Proteinkonzentration in mg/ml Lysat in jeder Probe gemessen. In der klinischen Chemie wurde als nächstes die CsA-Konzentration jeder Probe mittels liquid chromatography tandem Massenspektrometrie gemessen. Die Messmethode und der apparative Aufbau gleichen dabei derjenigen für das therapeutische Drug-Monitoring von CsA im Blut bei Patienten mit immunsuppressiver Therapie ^[161]. Aus diesen Messungen wurden die Konzentration CsA in ng/ml Myokardhomolysat bestimmt. Anschliessend wurde mathematisch die Konzentration von CsA pro Proteingewicht mit folgender Formel berechnet:

CsA/Protein =

$$((\text{Konzentration in ng/ml Myokardhomolysat} \cdot 10^{-9}) / 1202,61) / (\text{Protein mg/ml} \cdot 10^{-3}) \cdot 10^9$$

Die molare Masse von Ciclosporin A beträgt: 1202,61 g·mol⁻¹.

2.7. Kammerflimmern, Intervention

Während der 60 min Ischämie kam es bei 7 Tieren zu interventionsbedürftigem Kammerflimmern. Als erste Maßnahme wurde der Ballonkatheter entblockt, sodass wieder ein adäquater Perfusionsfluss der LAD gewährleistet war. Zusätzlich wurde mit cardiopulmonaler, mechanischer Reanimation begonnen. Um das Kammerflimmern zu unterbrechen, wurden die Tiere elektrisch mit 360J geschockt (Elektroden auf Sternum und linkslaterale Brustwand), bis das Kammerflimmern unterbrochen werden konnte und ein Sinusrhythmus hergestellt war. Pharmakologisch wurden Suprarenin (Suprarenin® Durchstechflasche 25 ml Injektionslösung 1:1000) unverdünnt, sowie in Verdünnung 1:10, Lidocain (Lidocard B. Braun 2 %) bei Bedarf über den peripheren Zugang appliziert. Bei vielen der Tiere konnte wieder ein suffizienter Kreislauf hergestellt werden, sodass die Ischämie nach

kurzer Unterbrechung fortgesetzt werden konnte. Bei einigen Tieren zeigten die Reanimationsversuche keinen Erfolg. Alle Daten dieser Tiere wurden konsequent aus der Auswertung genommen.

2.8. Ausschlusskriterien

Mehrfach in einem Versuch reanimierte Tiere wurden von der Datenanalyse ausgeschlossen, da nicht sicher gestellt werden konnte, ob überhaupt ein Infarkt induziert werden konnte.

Ansonsten wurden alle Tiere mit abnormalem Perfusionsfluss ($AAR/LV < 25\%$ oder Infarktgröße $< 20\%$) von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

2.9. Statistische Datenanalyse

Alle Daten wurden in Apple Numbers und Microsoft Excel gespeichert und analysiert. Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) angegeben. Zum Vergleich der Gruppen wurde der studentische t-test benutzt. Ein signifikanter Unterschied zwischen Gruppen wurde angenommen, wenn $p < 0,05$.

3. Material

(alle Tabellen mit freundlicher Genehmigung von Christine Rothe AG Prof. Boekstegers übernommen)

3.1. Narkose

Präparat	Wirkstoff	Konzentration	Packungseinheit	Dosierung	Entspricht
Stresnil®	Azaperon	40 mg/ml	100 ml Durchstechflasche	2 mg/kg	0,05 ml/kg = 0,5 ml / 10 kg
Atropinsulfat B. Braun 0,5 mg / ml	Atropinsulfat	0,5 mg/ml	1 ml Ampullen	0,02 - 0,04 mg/kg	0,04 - 0,08 ml/kg = 0,4 - 0,8 ml / 10 kg
Ketamin Inresa 10 ml	Ketaminhydrochlorid	50 mg/ml	10 ml Ampullen	10 - 25 mg/kg	0,2 - 0,5 ml/kg = 2 - 5 ml / 10 kg
Midazolam - ratiopharm® 15 mg / 3 ml	Midazolamhydrochlorid	5 mg/ml	3 ml Ampullen	0,5 - 1,5 mg/kg 0,03 - 0,1 mg/kg	0,1 - 0,3 ml/kg = 1 - 3 ml / 10 kg 0,006 - 0,02 ml/kg 0,06 - 0,2 ml / 10 kg
Propofol 2 % (20mg/1ml) MCT Fresenius	Propofol	20 mg/ml	50 ml Durchstechflasche	2 - 7 mg/kg 10 - 20 mg/kg/h	0,1 - 0,35 ml/kg = 1 - 3,5 ml / 10 kg 0,5 - 1 ml/kg/h = 5 - 10 ml / 10 kg / h
Forene®	Isofluran (1-Chloro-2,2,2-trifluoroethyl-difluoromethylether)		250 ml Flasche	0,8 - 1 Vol %	

Tabelle 1

3.2. Infusion

Präparat	Wirkstoff	Konzentration	Packungseinheit	Dosierung	Entspricht
Isotone Kochsalzlösung 0,9 % Braun	Natriumchlorid	9 mg/ml	500 ml Infusionsflasche	5 - 10 ml/kg/h	0,083 - 0,17 ml/kg/min = 2,5 - 5 ml / 30 kg / min = 2 - 3 Tropfen / kg / min = 1 - 2 Tr. / 30 kg / sec
Voluvex® 6 % Infusionslösung	Hydroxyethylstärke	60 mg/ml	500 ml Infusionsflasche	1,5 g/kg/d 20 - 40 ml/kg/d (Hd) 5 - 15 ml/kg/d (Ktz)	25 ml/kg/d = 1 ml/kg/h = 0,02 ml/kg/min = 12 Tr. / 30 kg / min 0,83 - 1,7 ml/kg/h = 0,01 - 0,03 ml/kg/min = 6 - 18 Tr. / 30 kg / min
Cordarex® Injektionslösung 150 mg / 3ml	Amiodaronhydrochlorid	50 mg/ml	3 ml Ampullen	150 mg / 500 ml NaCl	
Mg 50 % Inresa	Magnesiumsulfat - Heptahydrat	0,5 g/ml	10 ml Ampullen	5 g / 500 ml NaCl	

Tabelle 2

3.3. Antikoagulation

Präparat	Wirkstoff	Konzentration	Packungseinheit	Dosierung	Entspricht
Heparin - Natrium Braun 25 000 I.E. / 5 ml	Heparin - Natrium	5 000 I.E. / ml	5 ml Durchstechflasche	10 000 I.E. / Tier	2 ml / Tier
				100 - 200 I.E./ kg	0,02 - 0,04 ml/kg = 0,2 - 0,4 ml / 10 kg

Tabelle 3

3.4. Notfallmedikamente

Präparat	Wirkstoff	Konzentration	Packungseinheit	Dosierung	Entspricht
Suprarenin® Durchstechflasche 25 ml Injektionslösung 1:1000	Epinephrinhydrochlorid	1,2 mg/ml = 1 mg Epinephrin	25 ml Durchstechflasche	0,5 - 1 µg/kg	0,5 - 1 µl/kg = 5 - 10 µl / 10 kg 5 - 10 µl / kg 1:10 Verd. = 50 - 100 µl / 10 kg 1:10
				5 - 10 µg/kg	5 - 10 µl/kg = 50 - 100 µl / 10 kg 50 - 100 µl/kg 1:10 Verd. = 0,5 - 1 ml / 10 kg 1:10
				0,2 mg/kg	0,2 ml/kg = 2 ml / 10 kg 2 ml/kg 1:10 Verd. = 20 ml / 10 kg 1:10 Verd.
Lidocard B. Braun 2 %	Lidocainhydrochlorid 1 H ₂ O	20 mg/ml	5 ml Ampullen	1 - 4 mg/kg (Arrhythmie)	0,05 - 0,2 ml/kg = 0,5 - 2 ml / 10 kg
				30 mg/kg (Stillstand)	1,5 ml/kg = 15 ml / 10 kg
Dexa - ratiopharm® 40 mg Injektionslösung	Dexamethasondihydrogenphosphat	40 mg		0,2 - 2 mg/kg	
Dopamin Fresenius 200 mg / 5 ml	Dopaminhydrochlorid	40 mg/ml	5 ml Ampullen	120 - 600 µg/kg/h ³	3 - 15 µl/kg/h = 30 - 150 µl / 10 kg / h
ADREKAR®	Adenosin 6 mg physiolog. NaCl - Lösung 2 ml	3 mg/ml	2 ml Durchstechflasche	als Bolus nach Wirkung	3-6-9-12 ml
Nitrolingual® infus. 5 mg / 5 ml	Glyceroltrinitrat	1 mg/ml	5 ml Ampullen	60 - 180 µg/kg/h	60 - 180 µl/kg/h = 0,6 - 1,8 ml / 10 kg / h

Tabelle 4

3.5. Kontrastmittel

Präparat	Wirkstoff	Konzentration	Packungseinheit	Dosierung
Imeron® 350	Iomeprol		200 ml Infusionsflasche	Nach Bedarf

Tabelle 5

3.6. Schmerzmittel

Präparat	Wirkstoff	Konzentration	Packungseinheit	Dosierung	Entspricht
Novaminsulfon - ratiopharm® 2,5	Metamizol - Natrium - Monohydrat	0,5 g/ml	5 ml Ampullen	15 - 50 mg/kg	0,03 - 0,1 ml/kg = 0,3 - 1 ml / 10 kg
Fentanyl® - JANSSEN 0,5 mg	Fentanylcitrat	50 µg/ml	10 ml Ampullen	2 - 7 µg / kg	0,04 - 0,14 ml/kg = 0,4 - 1,4 ml / 10 kg
Dipidolor 15 mg / 2 ml	Piritramid	7,5 mg/ml	2 ml Ampullen	0,05 - 0,1 mg/kg (Kind)	7 - 13 µl/kg = 70 - 130 µl / 10 kg
				7,5 - 22,5 mg (Erw.)	1 - 3 ml
Pancuronium Inresa 4 mg / 2 ml	Pancuroniumbromid	2 mg/ml	2 ml Ampullen	0,04 - 0,1 mg/kg	0,02 - 0,05 ml/kg = 0,2 - 0,5 ml / 10 kg

Tabelle 6

3.7. Antibiose

Präparat	Wirkstoff	Konzentration	Packungseinheit	Dosierung	Entspricht
Cefuroxim Hikma 1500 mg Trockensubstanz	Cefuroxim - Natrium	1500 mg	Durchstechflasche	750 mg / Tier	in 50 ml 0,9 % NaCl gelöst

Tabelle 7

3.8. Immunsuppressiva

Präparat	Wirkstoff	Konzentration	Packungseinheit	Dosierung	Entspricht
Sandimmun®	Cyclosporin A	50 mg/ml	5 ml Ampullen	5 mg / kg	

Tabelle 8

3.9. Ligaturen und Nahtmaterial

Präparat	Stärke	Aufbau	Verhalten	Verwendung	Hersteller
Ethicon® Perma - Hand Seide	1 (4 Ph. Eur.)	schwarz, geflochten	nicht resorbierbar	Gefäßligaturen	Johnson - Johnson Intl.
Suprolene	0 USP (3,5 metric)	grün	nicht resorbierbar	Wundverschluss	Resorba

Tabelle 9

3.10. Augensalbe

Präparat	Wirkstoff	Konzentration	Packungseinheit	Dosierung	Entspricht
Isopto - Max® 3,5 g Augensalbe	Dexamethason	1 mg/g Salbe	3,5 g Tube	Nach Bedarf	
	Neomycinsulfat	3500 I.E./g Salbe			
	Polymyxin - B - Sulfat	6000 I.E./g Salbe			

Tabelle 10

3.10. Beta-Blocker

Präparat	Wirkstoff	Konzentration	Packungseinheit	Dosierung	Entspricht
Concor® 5 mg	Bisoprololhemifumarat	5 mg / Tablette	30 Filmtabletten	2,5 mg pro Tier	

Tabelle 11

3.11. Gel- und Pufferzusammensetzungen für den Western Blot

(Auflistung mit freundlicher Genehmigung nach Michael Thormann, AG Prof. Boekstegers,)

<u>Gel</u>	<u>Substanzen</u>	<u>Volumina</u>
Laufgel (10 %)	30 % AA-bis-AA ProtoGel (30 % Acrylamid/Methylen Bisacrylamid-Lösung, National Diagnostics, Atlanta, USA)	6,4 ml
	1 M Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Puffer (pH 8,8) (PUFFERAN®, ≥99,3 %, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRD DEUTSCHLAND)	7,5 ml (pH 6,8)
	H ₂ O	5,55 ml
	20 % Sodium n-Dodecyl-Sulfat 20 % Lösung (SDS, Merck KGaA, Darmstadt, BRD DEUTSCHLAND)	100 µl
	10 % Ammoniumperoxidsulfat-Lösung (APS, Merck KGaA, Darmstadt, BRD DEUTSCHLAND)	400 µl
	Tetramethylethyldiamin (Temed, Merck KGaA, Darmstadt, BRD DEUTSCHLAND)	15 µl

Tabelle 12

Sammelgel (4 %)	30 % AA-bis-AA ProtoGel (30 % Acrylamid/Methylen Bisacrylamid-Lösung, National Diagnostics, Atlanta, USA)	1,3 ml
	1 M Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Puffer (pH 8,8) (PUFFERAN®, ≥99,3 %, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRD DEUTSCHLAND)	1,25 ml
	H ₂ O	7,2 ml
	20 % Sodium n-Dodecyl-Sulfat 20 % Lösung (SDS, Merck KGaA, Darmstadt, BRD DEUTSCHLAND)	50 µl
	10 % Ammoniumperoxidsulfat-Lösung (APS, Merck KGaA, Darmstadt, BRD DEUTSCHLAND)	200 µl
	Tetramethylethyldiamin (Temed, Merck KGaA, Darmstadt, BRD DEUTSCHLAND)	10 µl

Tabelle 13

<u>Puffer</u>	<u>Substanzen und Einwaagen</u>	<u>Endvolumina</u>
Lämmli-puffer	140 mM TrisHCl pH7, 30 % Glycin, 4 % SDS (jeweils Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRDDEUTSCHLAND), 16 % Beta-Mercaptoethanol, 0,1 % Bromphenolblau (jeweils Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA)	auf 10 ml H ₂ O
Laufpuffer	Tris-Base 3,03 g, Glycine 14,4 g, SDS 1,0 g (jeweils Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRDDEUTSCHLAND)	auf 1 Liter H ₂ O
Blottingpuffer	Tris-Base 3,03 g, Glycine 14,4 g und 200 ml Methanol (jeweils Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRDDEUTSCHLAND)	auf 1 Liter H ₂ O
Anmerkung:	Alle Stammlösungen wurden eigens im Labor angesetzt	
Antikörper	<p>AKT goat IgG Antibody SC 1618, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA</p> <p>pAKT rabbit IgG polyclonal SC16646R Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA</p> <p>ERK1/2 rabbit polyclonal 9102 Cell Signalling Technology Inc, Danvers MA, USA</p> <p>pERK1/2 mouse monoclonal SC 81492 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA</p> <p>GSK 3β 9315 rabbit antibody Cell Signalling Technology Inc, Danvers MA, USA</p> <p>pGSK3β rabbit polyclonal IgG 9336 Cell Signalling Technology Inc, Danvers MA, USA</p> <p>β-Actin Antibody 4967 Cell Signalling Technology Inc, Danvers MA, USA</p>	

Tabelle 14

4. Ergebnisse

Insgesamt wurden 37 Tiere der Rasse „Deutsches Landschwein“ mit einem mittleren Gewicht von $31,9\text{kg} \pm 1,6$ in den Versuch genommen. 28 Tiere überlebten den ersten Versuchstag und konnten in den zweiten Teil des Experiments übernommen werden. 7 Tiere verstarben durch reanimationsrefraktäres Kammerflimmern am Tag eins. 2 Tiere wurde nicht in die Versuchsauswertung hineingenommen, da sie entweder multiple Episoden Kammerflimmerns durchleiden mussten und keinen adäquaten Infarkt entwickelt haben, oder eine anomale Koronaranatomie aufwiesen, die nicht mit den anderen Versuchstieren zu vergleichen war. Von den 28 am Tag 2 untersuchten Tieren verstarben 4 vor der Fertigstellung aller hämodynamischen Messungen (1 Kontrolle, 2 IPoc, 1 CsA Retroinfusion). Bei einem Tier der Gruppe IPoc gab es technische Probleme, sodass am Tag 2 die Messungen zu $dp/dt \text{ max/min}$ nicht auszuwerten waren. Insgesamt haben wir einen vollen Datensatz von 23 Tieren auswerten können (Kontrolle $n=7$; IPoc $n=5$; CsA i.v. $n=6$; CsA Retroinfusion $n=5$). Die Infarktauswertung und MPO - Messung konnte bei insgesamt 28 Tieren durchgeführt werden.

	Kontrolle	IPoc	CsA i.v.	CsA Retroinf.	nicht zugeordnet	total
Totale Versuchstieranzahl	8	10	9	8	2	37
Erreichen von Tag 2	8	9	7	6	-	30
entfernt aus Auswertung	-	1	1	-	-	-2
unvollständiger Datensatz	1	3	-	1	-	4
kompletter Datensatz	7	5	6	5	-	23

Tabelle 15: Darstellung der Tierzahlen und Datensätze.

4.1. Infarktgrößen

Die Infarktgröße (Kontrolle n=8; IPoc n=8; CsA i.v. n=6; CsA Retroinf. n=6) der einzelnen Gruppen wurden als Infarkt in % linker Ventrikel, Infarkt in % der AAR und AAR in % linker Ventrikel planimetrisch ausgemessen. Als Area at risk wird der Myokardteil beschrieben, der distal des Gefäßverschlusses liegt und dem vollen Risiko der Ischämie ausgesetzt ist. Die Angabe der Größe AAR in % linker Ventrikel dient dabei als Kontrolle unter den Gruppen, um vergleichbare Infarktbedingungen abschätzen zu können (Kontrolle $58,66 \pm 1,27$, IPoc: $51,1 \pm 3,95$, CsA i.v.: $51,36 \pm 3,63$, CsA Retroinf. $57,67 \pm 4,19$) (siehe Abb. 26). Bezogen auf den Infarkt in % linker Ventrikel ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Kontrolle: $35,4 \pm 0,9$; IPoc: $30,3 \pm 2,12$; CsA i.v.: $28,41 \pm 2,7$; CsA Retroinf.: $27,5 \pm 4,29$) (siehe Abb. 24). Ebenso konnten keine signifikanten Unterschiede bei Infarkt in % der AAR gezeigt werden (Kontrolle: $56,68 \pm 2,2$; IPoc: $53,85 \pm 2,35$; CsA i.v.: $48,93 \pm 3,9$; CsA Retroinf.: $45,5 \pm 6,04$) (siehe Abb. 25). Die Daten zeigen lediglich einen positiven Trend in der Infarktreaktion bei den CsA behandelten Tieren (Inf%LV und Inf%AAR): Kontrolle > IPoc > CsA i.v. > CsA Retroinfusion.

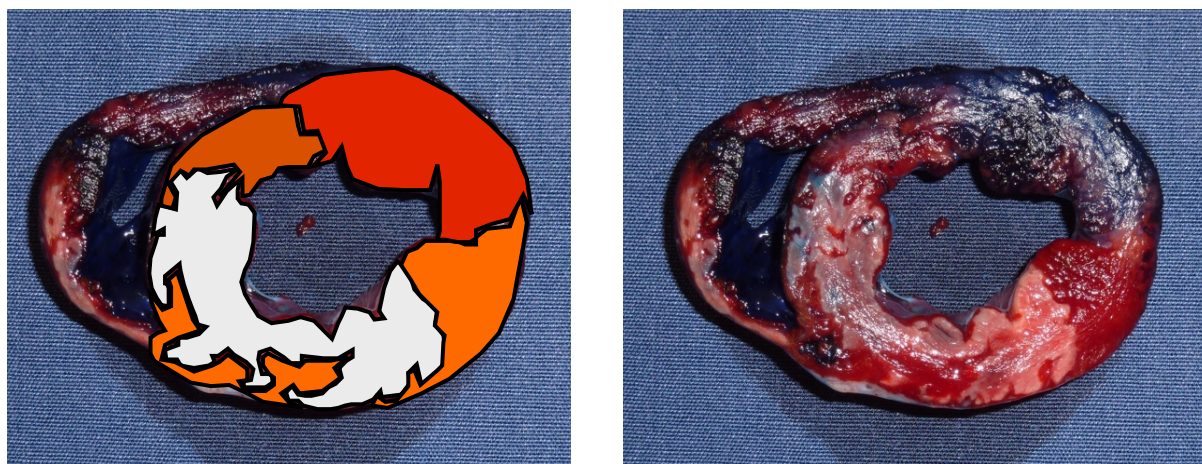


Abb.23: Repräsentativer Schnitt zur Infarktauswertung: weiss → infarziertes LAD-Areal; orange → AAR; rot → Rcx Kontrollareal

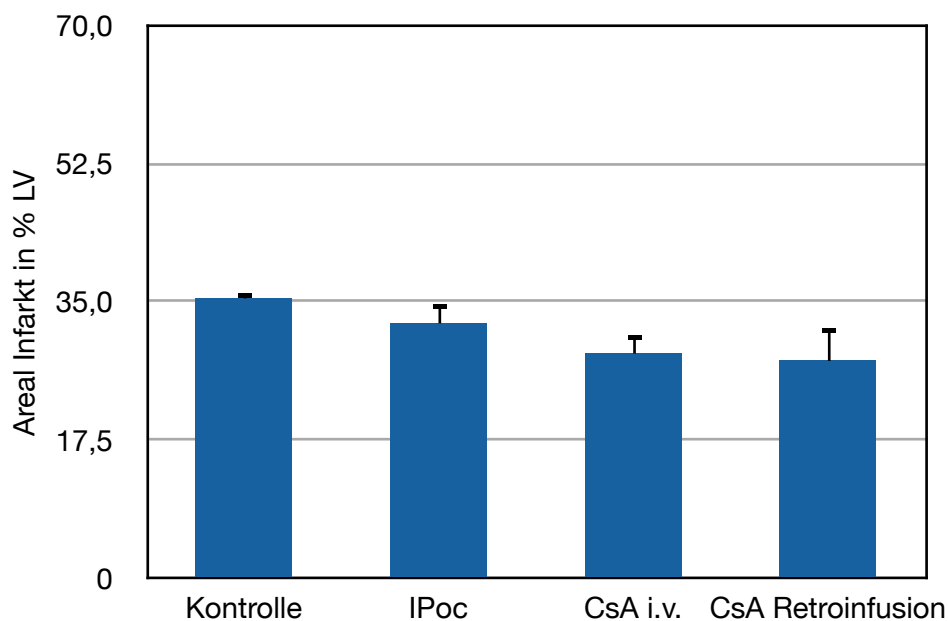


Abb. 24: Prozentueller Anteil Infarkt vom linkem Ventrikel. Es konnten keine signifikanten Unterschiede detektiert werden, jedoch war eine Tendenz erkennbar. In allen Interventionsgruppen scheint der Infarkt%LV kleiner mit einer maximalen Reduktion in den Gruppen CsA i.v. und CsA Retroinfusion. (Alle Werte MEAN ± SEM) (Kontrolle n=8; IPoc n=8; CsA i.v. n=6; CsA Retroinf. n=6)

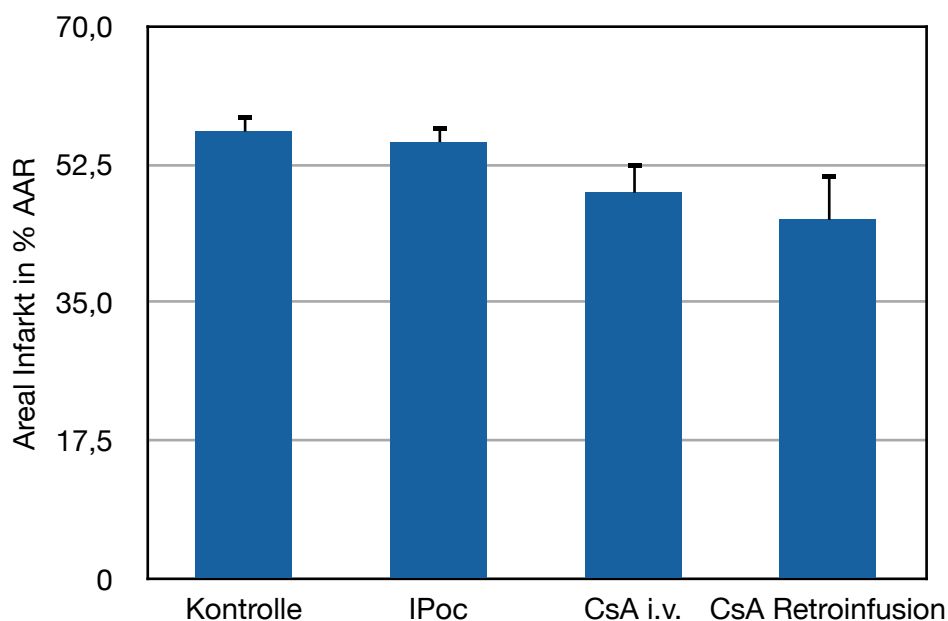


Abb.25: Prozentueller Anteil Infarkt von der AAR. Keine signifikanten Werte ermittelbar. Zu erkennen ist eine Tendenz der Infarktreduktion in allen Interventionsgruppen, mit einem Maximum der CsA i.v. und CsA Retroinfusion - Interventionsgruppen. (Alle Werte MEAN ± SEM) (Kontrolle n=8; IPoc n=8; CsA i.v. n=6; CsA Retroinf. n=6)

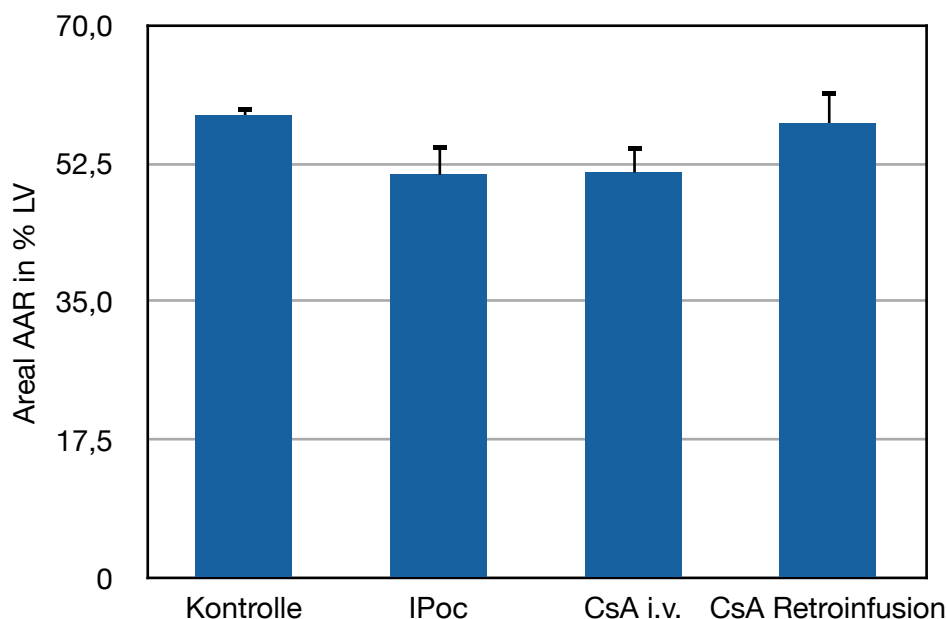


Abb.26: Prozentueller Anteil der AAR vom linken Ventrikel. Hierbei zeigten sich leichte Unterschiede in der Größe AAR % LV zwischen den Gruppen, die jedoch nicht signifikant waren. Im Regelfall erzeugt eine Ballondilatation hinter dem 1.DA zur Ischämieinduktion eine AAR%LV von ca. 55%. (Alle Werte MEAN ± SEM) (Kontrolle n=8; IPoc n=8; CsA i.v. n=6; CsA Retroinf. n=6)

4.2. Myeloperoxidase

Die Myeloperoxidase als Enzym der Neutrophilen Granulozyten gibt Aufschluss über die Höhe der Ansammlung der PMN in den jeweiligen Myokardgebieten. Im Rahmen der Ischämie mit nekrotischen Myokardanteilen und der Reperfusion, kommt es zu einer vermehrten Ansammlung von Neutrophilen Granulozyten im Infarktgebiet. Je größer der entzündliche Stimulus im Rahmen der Ischämie/Reperfusion, desto mehr Granulozyten aggregieren im Infarkt/AAR-Gebiet, desto höher auch die photometrische Messung an Myeloperoxidase. Alle 3 Bereiche, also Rcx-Versorgungsgebiet als Kontrolle, AAR und Infarktareal wurden in jeder Gruppe untersucht und die Anzahl an Leukozyten in „Leukozytenzahl pro mg Feuchtgewicht“ angegeben.

Im Kontrollbereich (Rcx, siehe Abb. 27) wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen bemerkt. Die Anzahl an Leukozyten war in jeder Gruppe vergleichbar gering: Kontrolle n=8: $617,75 \pm 97,95$; IPoc n=8: $913,63 \pm 103,5$; CsA i.v. n=6: $910,5 \pm 116,74$; CsA Retroinf. n=6: $836,83 \pm 107,385$ Leukozytenzahl pro mg FG.

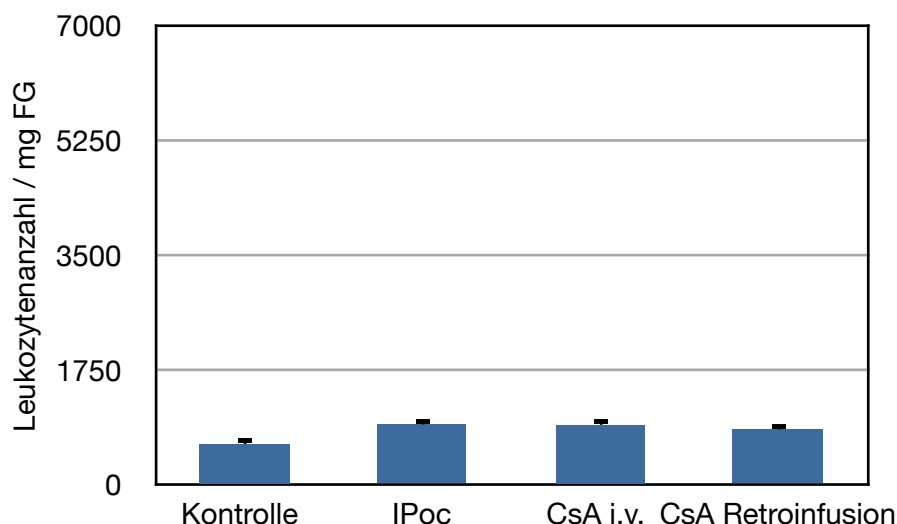


Abb. 27: Myeloperoxidase - Messung im Rcx (Kontroll-)Bereich. Leukozytenzahl / mg FG. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen detektierbar. In jeder Gruppe befindet sich im Kontrollareal eine vergleichbar geringe Anzahl an PMN. (Alle Werte MEAN ± SEM) (Kontrolle n=8, IPoc n=8, CsA i.v. n=6, CsA Retroinf. n=6)

Im Bereich AAR (siehe Abb, 28) war die Anzahl der Leukozyten/mg FG im Vergleich zur Rcx vergleichbar. Einzig die Leukozytenanzahl im AAR-Bereich in der Gruppe CsA Retroinfusion war erhöht, jedoch nicht signifikant im Vergleich zur AAR der Kontrollgruppe (CsA Retroinfusion $1798,5 \pm 425,72$ vs. Kontrollgruppe AAR $1395,4 \pm 415,5$ $p=0,56$ Leukozytenzahl pro mg FG) oder zu den anderen Gruppen.

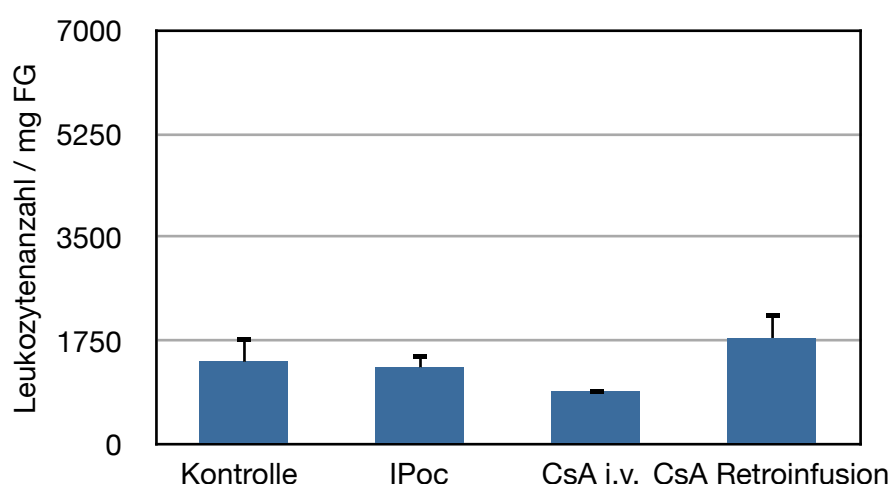


Abb.28: Myeloperoxidase-Messung im AAR-Bereich. Leukozytenzahl / mg FG. Die Werte sind mit denen im Rcx-Bereich vergleichbar. Auffällig ist, die höhere Leukozytenzahl in der Gruppe CsA Retroinfusion gegenüber den anderen Gruppen. Keine signifikanten Unterschiede untereinander. (Alle Werte MEAN ± SEM) (Kontrolle n=8, IPoc n=8, CsA i.v. n=6, CsA Retroinf. n=6)

Im Infarktgebiet war die Leukozytenzahl in allen Gruppen im Vergleich zur Rcx-Areal erhöht (siehe Abb. 29). Untereinander ergaben sich im Infarktgebiet zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede (Kontrolle: $3790,75 \pm 575,11$ vs. IPoc $3737,25 \pm 676,81$ vs. CsA i.v. $2415 \pm 725,06$ vs. CsA Retroinf. $2956,67 \pm 543,51$ Leukozytenzahl pro mg FG).

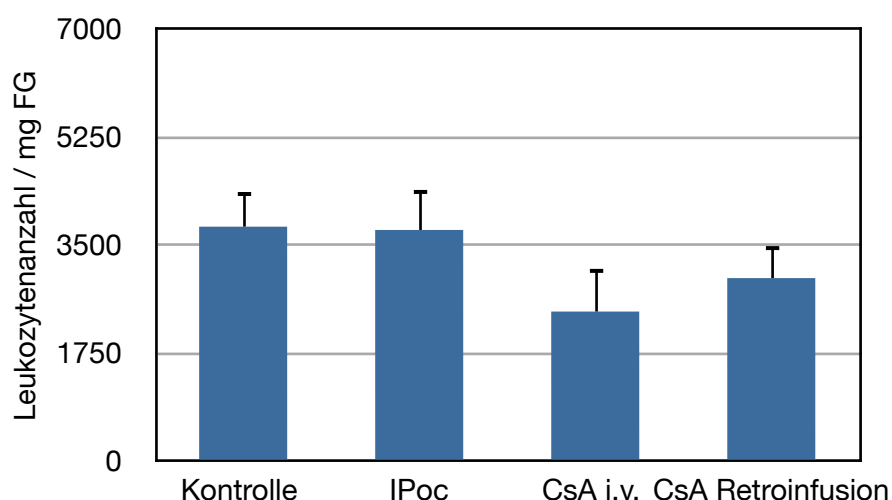


Abb. 29: Myeloperoxidase-Messung im Infarkt-Bereich. Leukozytenzahl / mg FG. Keine signifikanten Unterschiede unter den Gruppen. (Alle Werte MEAN \pm SEM) (Kontrolle $n=8$, IPoc $n=8$, CsA i.v. $n=6$, CsA Retroinf. $n=6$)

4.3. Globale Myokardfunktion nach Ischämie und Reperfusion: LVEDP, Ejektionsfraktion, dP/dt.

Zur Einschätzung der globalen Myokardfunktion wurden am Tag 1 und am Tag 2 vor der Sternotomie der LVEDP, die maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit dP/dt max, sowie dP/dt min und die Ejektionsfraktion des Herzens bestimmt.

4.3.1. Ejektionsfraktion

Als weiterer Marker der globalen Herzfunktion wurden die Ejektionsfraktionen am Tag 1 und Tag 2 bestimmt. Durch den Verlust an Myokard, bzw. die funktionelle Beeinträchtigung des Myokardgewebes ist eine Verminderung der Ejektionsfraktion am Tag 2 zu erwarten. Allgemein konnte eine signifikante Abnahme der Ejektionsfraktion nach Infarkt in jeder Gruppe beobachtet werden: Kontrolle Tag 1 $53,57 \pm 2,04$ vs. Tag 2 $35,03 \pm 3,1$; IPoc Tag 1 $53,99 \pm 1,66$ vs. Tag 2 $40,53 \pm 2,13$;

CsA i.v. $56,55 \pm 1,65$ vs. Tag 2 $43,27 \pm 1,98$; CsA Retroinf. Tag 1 $52,52 \pm 2,40$ vs. Tag2 $37,84 \pm 2,90$, EF in %, alle $p < 0,05$ (siehe Abb. 30). Zu bemerken ist, dass in der Kontrollgruppe und in der Gruppe CsA Retroinfusion der stärkste Einbußen an Ejektionsfraktion zu vermerken ist. Die Ejektionsfraktion in den Gruppen IPoc und CsA i.v. scheint dagegen weniger beeinträchtigt. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, welche auf einen Benefit durch eine bestimmte Therapieform hinweisen könnte.

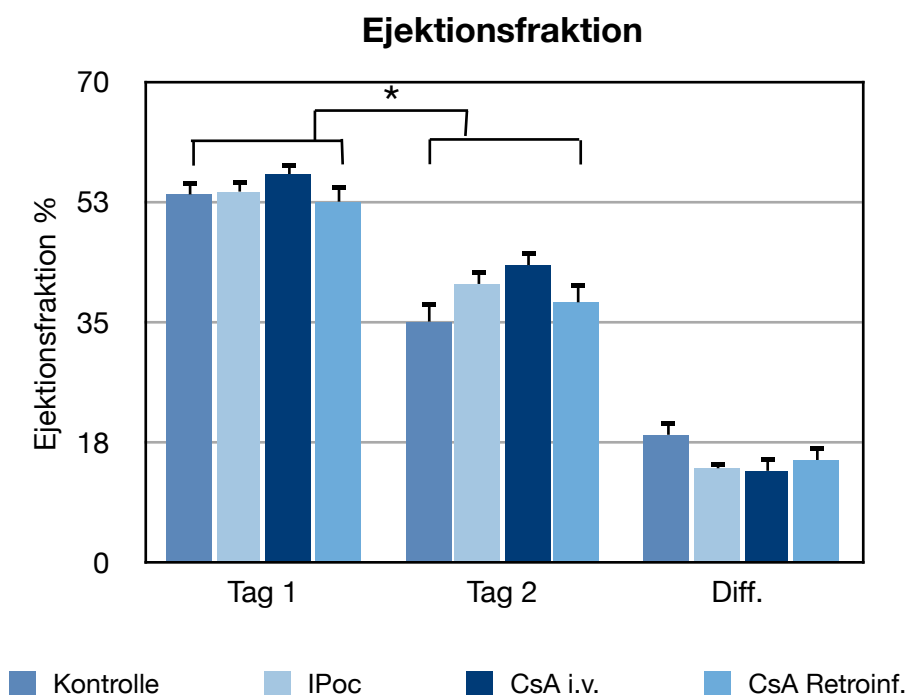


Abb.30: Ejektionsfraktion in % Tag 1 im Vergleich zu Tag 2 und Differenz. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. (Alle Werte MEAN \pm SEM) (Kontrolle $n=6$, IPoc $n=8$, CsA i.v. $n=6$, CsA Retroinf. $n=5$).

4.3.2. LVEDP

Der LVEDP gilt als frühzeitiger, sensitiver Marker für die kardiale Funktion und deren Verlust. Im Falle einer kardialen Funktionseinschränkung, wie sie durch einen Herzinfarkt zu erwarten ist, würde natürlicherweise der LVEDP ansteigen. Die Werte wurden, wie schon beschrieben, an Tag 1 vor dem Infarkt und am Tag 2 nach 24h Reperfusion gemessen.

Wie erwartet stieg der LVEDP (mmHg) an Tag 2 in jeder Gruppe im Vergleich zu Tag 1 an: Kontrolle Tag1: $7,39 \pm 0,3$ vs. Tag 2: $11,38 \pm 0,3$; IPoc Tag1: $7,75 \pm 0,4$ vs. Tag

2: $11,37 \pm 0,9$; CsA i.v. Tag1: $7,58 \pm 0,2$ vs. Tag2: $10,89 \pm 0,2$; CsA Retroinfusion Tag1: $7,04 \pm 0,1$ vs. Tag 2: $10,8 \pm 0,9$ (siehe Abb. 31). Weder am Tag 2, noch in der ausgerechneten Differenz zwischen Tag 1 und Tag 2, gab es signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

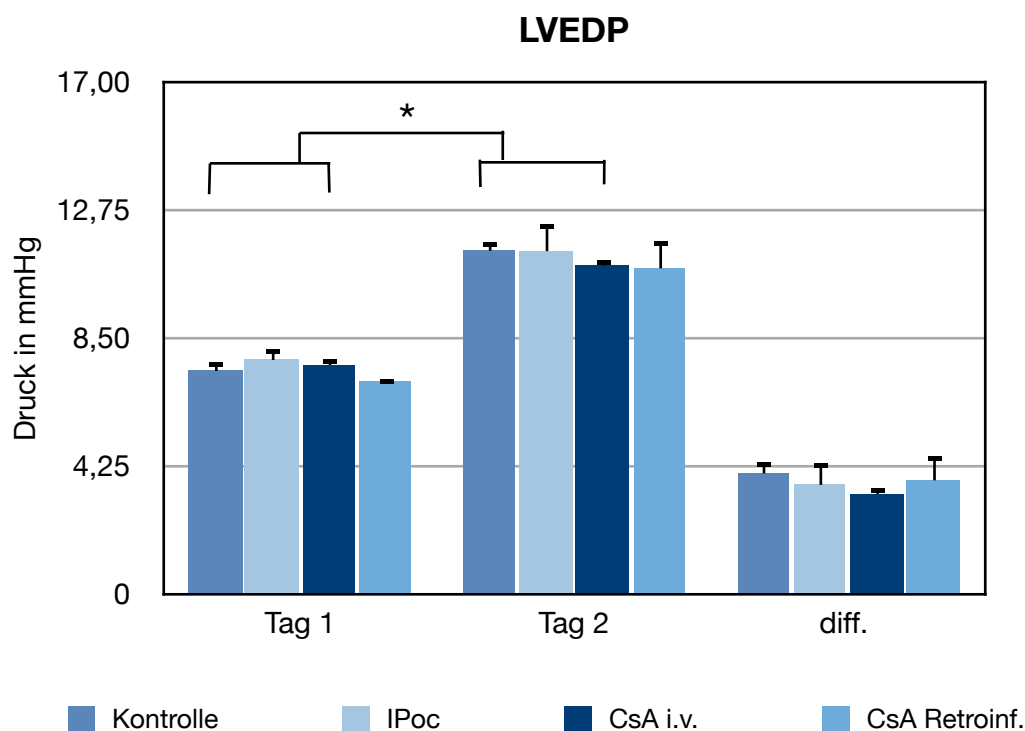


Abb.31: Linksventrikulärer entdiastolischer Druck, LVEDP. Aufgetragen für die zwei Versuchstage, sowie die Differenz. Alle Werte am Tag 2 sind signifikant unterschiedlich zum jeweiligen Gruppenwert am Tag 1. (Alle Werte in mmHg, MEAN \pm SEM, * $p < 0,05$) (Kontrolle $n=8$, IPoc $n=8$, CsA i.v. $n=6$, CsA Retroinf. $n=5$)

4.3.3. dp/dt max/min

Als weiterer Marker der myokardialen Kontraktilität (dp/dt max) bzw. Relaxation (dp/dt min) wurde die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit des linken Ventrikels in der Systole gemessen (dLVP /dt = dp/dt). Die Messung fand sowohl am Tag 1 vor Ischämie, als auch am Tag 2 nach 24 h Reperfusion statt. Ausserdem wurden die Messungen während des linksatrialen pacings am Tag 2 durchgeführt, um die Kontraktilität unter Stressbelastung zu testen (Messung bei Pacing 80, 100, 120, 140 und 150/Minute).

In Abb. 32 sind die Druckwerte dp/dt max für Tag 1 und 2 in mmHg/s² wiedergegeben. Lediglich durch CsA i.v. konnte die LV Kontraktilität trotz Infarkt

nahezu erhalten werden. In allen anderen Gruppen kam es zu einer signifikanten Abnahme der Kontraktilität nach Intervention (Kontrolle Tag 2 $882,31 \pm 117,20$ vs. Tag 2 $1261,78 \pm 118,76$; IPoc Tag 2 $905,34 \pm 152,27$ vs. Tag 1 $1800,66 \pm 165,82$; CsA Retroinfusion Tag 2 $695,8 \pm 92,02$ vs. Tag 1 $1286,82 \pm 94,34$; alle in dp/dt mmHg/s^2 , $p < 0,05$). Anzumerken ist der hohe Ausgangswert in der IPoc-Interventionsgruppe. Diese Gruppe ist von Beginn an signifikant unterschiedlich zu den anderen Gruppen am Tag 1: IPoc $1800,66 \pm 165,82$ vs. $1261,78 \pm 118,76$ (Kontrolle) oder $1218 \pm 46,5$ (CsA i.v.) oder $1286,82 \pm 94,34$ (CsA Retroinfusion) (alle Werte in dp/dt mmHg/s^2 , $*p < 0,05$).

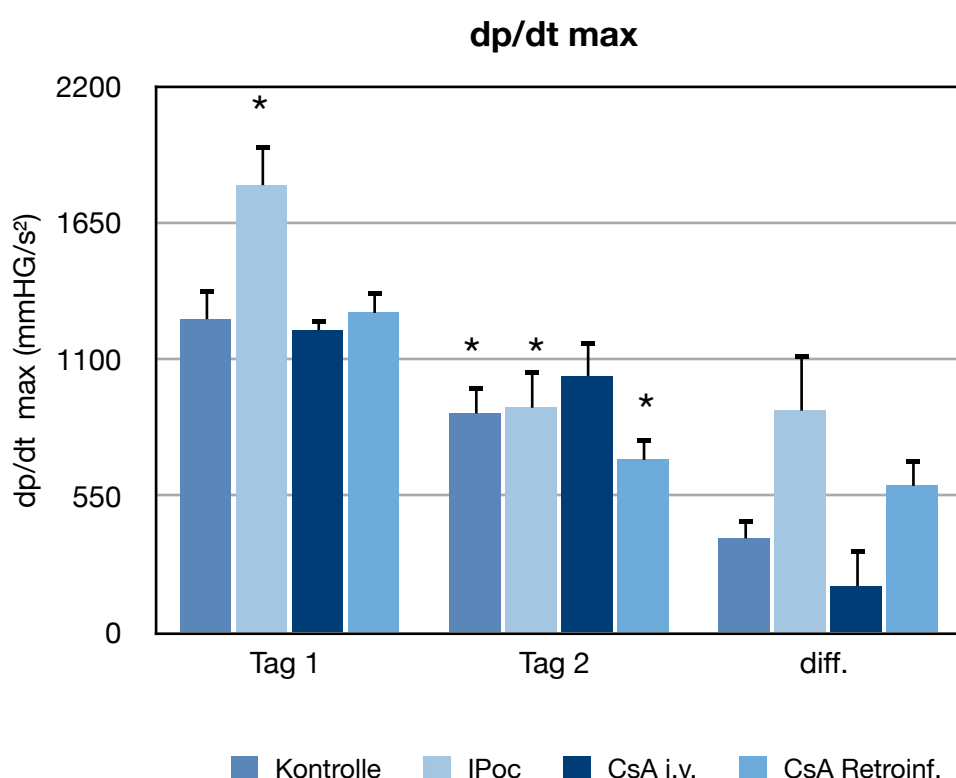


Abb. 32: dp/dt max Tag 1 (vor Ischämie) vs. Tag 2 (nach 24 h Reperfusion) und die Differenz. MEAN \pm SEM, $p < 0,05$. Kontrolle $n=8$; IPoc $n=8$; CsA i.v. $n=6$; CsA Retroinfusion $n=5$

In Abb. 33 ist die Kontraktilität am Tag 2 also nach 24h Reperfusion für die oben genannten pacing - Frequenzen aufgezeigt. Hierbei gab es keine signifikanten Unterschiede unter den Gruppen. Es fällt jedoch auf, dass die Druckanstiegsgeschwindigkeit der Gruppe CsA Retroinfusion im Vergleich zur Kontrolle schlechter, die Gruppen CsA i.v. und IPoc jedoch besser als die der Kontrolle ausfällt.

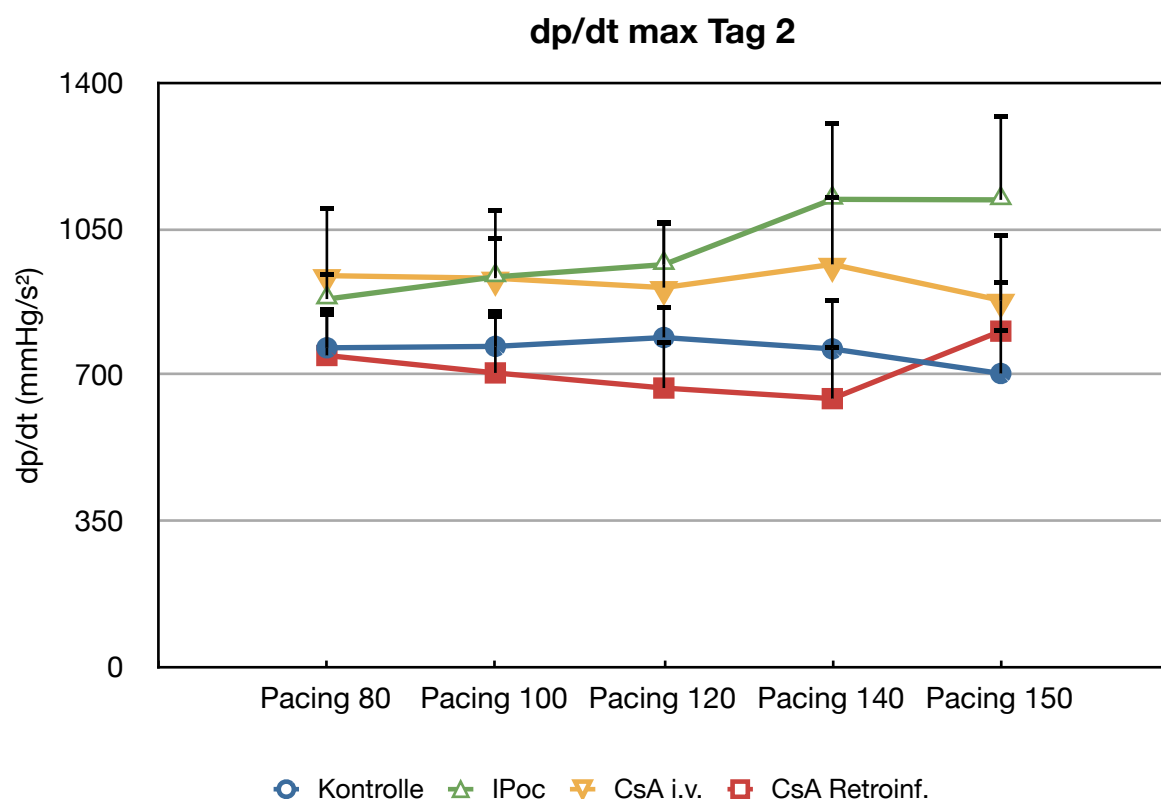


Abb. 33: dp/dt max am Tag 2 unter Pacing. Alle Daten $MEAN \pm SEM$, keine signifikanten Unterschiede unter den Gruppen. Kontrolle $n=7$; IPoc $n=5$; CsA i.v. $n=6$; CsA Retroinfusion $n=5$.

Zur Charakterisierung der linksventrikulären Relaxation in der Diastole kann als weiterer Marker der dp/dt min herangezogen werden. Der dp/dt min wurde zusammen mit dem dp/dt max unter Schrittmacherfunktion für die einzelnen Frequenzen bestimmt. Hierbei zeigte die Gruppe IPoc signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe für die Frequenzen 140 und 150/min: pacing 140/min IPoc $-1088,75 \pm 85,15$ vs. Kontrolle $-695,08 \pm 146,75$ und pacing 150/min IPoc $-1044,43 \pm 98,70$ vs. Kontrolle $-619,04 \pm 129,06$ dp/dt mmHg/s², $p < 0,05$ (siehe Abb. 34). Die Tiere der Gruppe CsA Retroinfusion zeigten allgemein die größte Beeinträchtigung der Relaxation. Signifikante Werte waren bei pacing 120 und 140/min pacing im Vergleich zur IPoc-Interventionsgruppe zu beobachten: pacing 120/min CsA Retroinf. $-592 \pm 133,14$ vs. IPoc $-1018,4 \pm 113,42$ und pacing 140/min CsA Retroinf. $-562,6 \pm 143,82$ vs. IPoc $-1088,75 \pm 85,15$ dp/dt mmHg/s², $p < 0,05$.

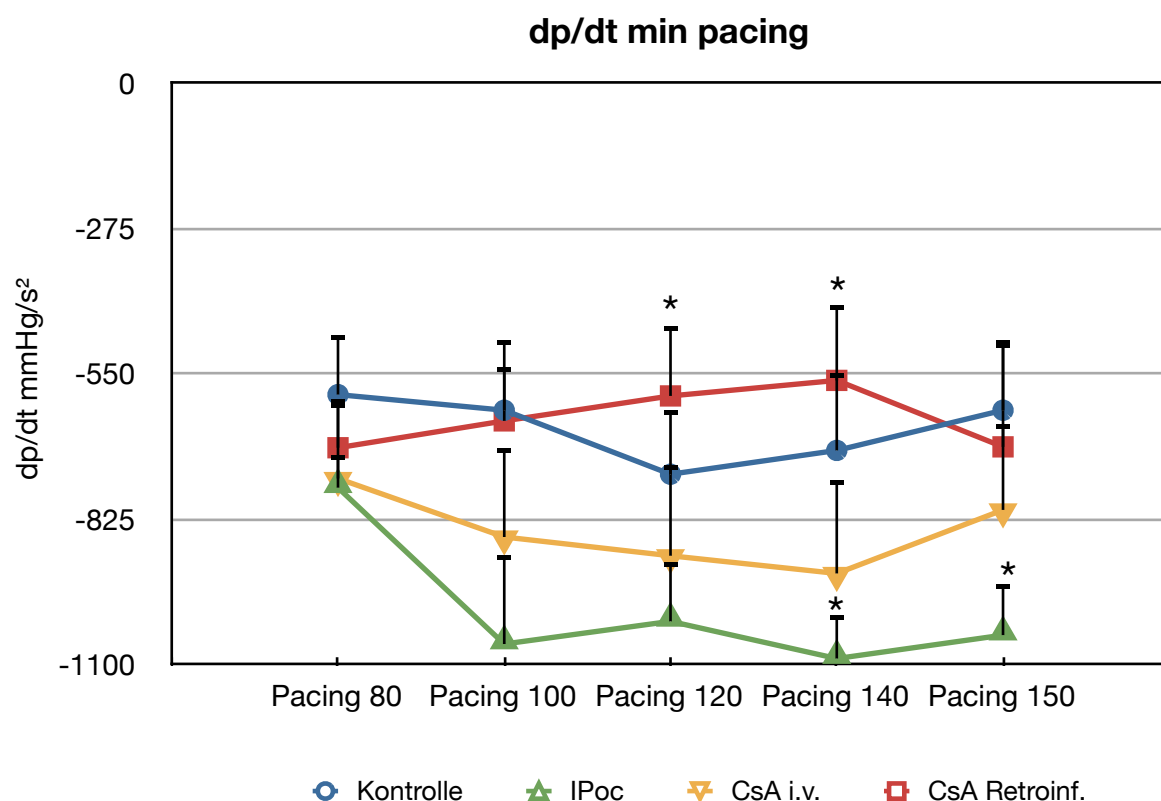


Abb. 34: dp/dt min am Tag 2 unter Pacing. Alle Daten $MEAN \pm SEM$, Kontrolle $n=7$; IPoc $n=5$; CsA i.v. $n=6$; CsA Retroinfusion $n=5$, $*p<0,05$

4.4. Regionale Myokardfunktion: Sonomikrometrie - Segmentverkürzung

Wie schon beschrieben erfolgte die Messung der regionalen Kontraktilität in den Myokardarealen AAR, LAD, RCX, in ebensolcher zeitlicher Reihenfolge. Die Kontraktilität wurde sowohl in Ruhe, als auch in verschiedenen Stadien mit gesteigertem Sauerstoffbedarf gemessen (Pacing 80, 100, 120, 140 und 150/min).

Im Kontrollbereich (Rcx, Abb. 35) gab es keine signifikanten Unterschiede der Gruppen bezüglich der regionalen Myokardfunktion. In allen Gruppen erfolgte eine gleichmässige Abnahme der Kontraktilität mit höherer Schrittmacherstimulation.

Im Bereich der proximalen LAD (AAR-Bereich, Abb. 36) zeigten vor allem die per Retroinfusion mit CsA behandelten Tiere eine schlechtere Kontraktilität. Die Unterschiede erreichten signifikantes Niveau gegenüber der Gruppe mit CsA i.v. behandelten Tiere für die Schrittmacherfrequenzen zwischen 80 und 140/min: z.B. pacing 80 CsA i.v. $20.93 \pm 2,23$ vs. CsA Retroinf. $9,83 \pm 1,31$ %EDL $p<0,05$. Zwischen der Gruppe CsA Retroinfusion und der Kontrolle ergaben die Daten der Segmentverkürzungen bei pacing 80 und 120 ebenfalls signifikante Unterschiede:

pacing 80 Kontrolle $15,46 \pm 1,43$ vs. CsA Retroinfusion $9,83 \pm 1,31$ %EDL $p < 0,05$; pacing 120 Kontrolle $13,16 \pm 1,52$ vs. $7,698 \pm 1,04$ %EDL $p < 0,05$. Die Kontroll-Gruppe, zusammen mit IPoc und CsA i.v. zeigten untereinander keine signifikanten Unterschiede, wenngleich festzustellen ist, dass die Gruppe CsA i.v. durchgehend die höchste regionale Myokardkontraktilität gegenüber den anderen Gruppen aufweist: z.B. pacing 80 CsA i.v. $20,93 \pm 2,23$ vs. Kontrolle $15,46 \pm 1,43$ vs. IPoc $17,15 \pm 2,46$ %EDL = n.s.

Im Bereich der distalen LAD (siehe Abb.37) zeigten alle Gruppen eine etwa gleich schlechte, im Vergleich zum RCX und proximalen LAD (AAR-) Bereich geringere regionale Kontraktilität. Es ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede unter den Gruppen.

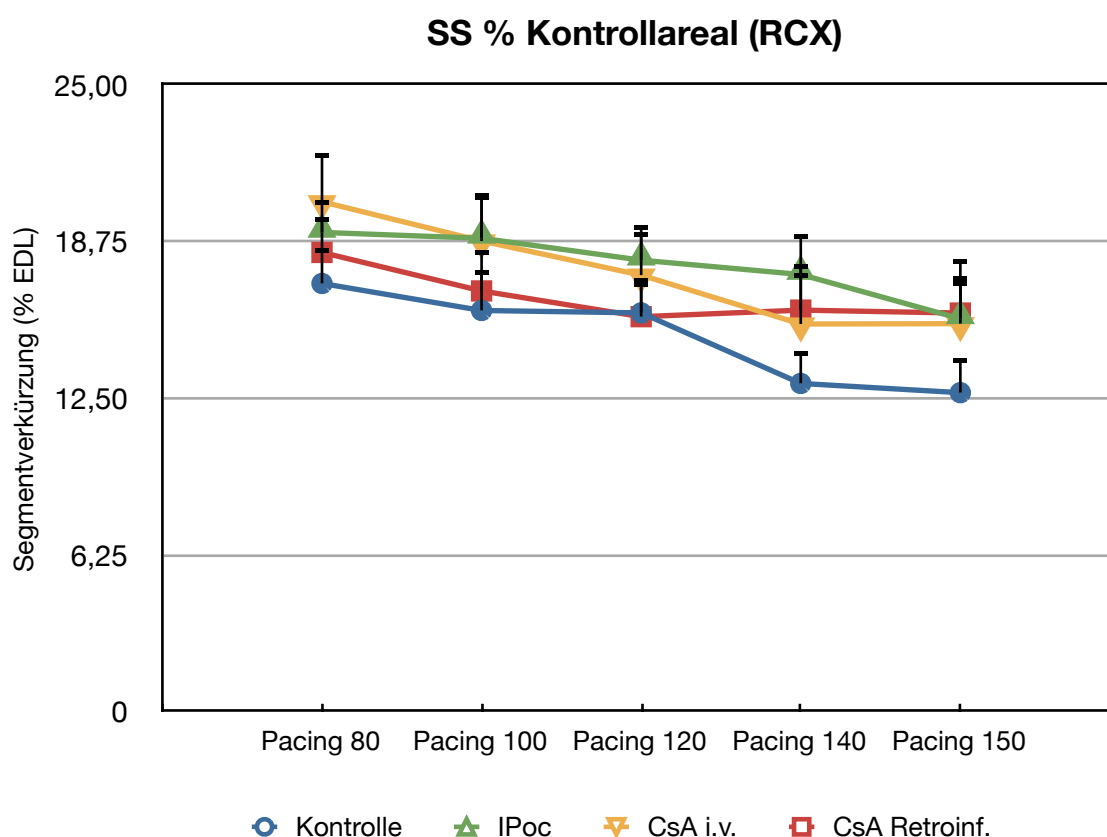


Abb. 35: Regionale Myokardfunktion im RCX - Kontrollbereich. Segmentverkürzung in % der enddiastolischen Länge. Pacing = rechtsatriale Schrittmacherstimulation. Kontrolle $n=7$; IPoc $n=6$; CsA i.v. $n=6$; CsA Retroinfusion $n=5$. MEAN \pm SEM

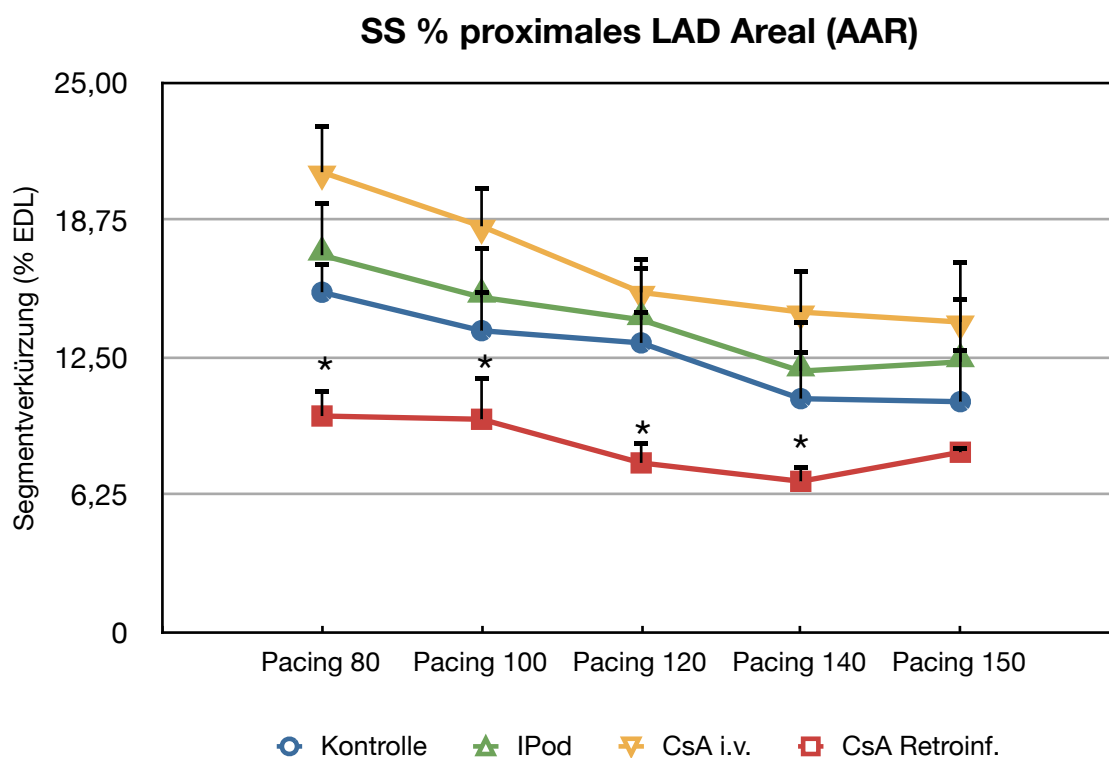


Abb. 36: Regionale Myokardfunktion im AAR - Bereich. Segmentverkürzung in % der enddiastolischen Länge. Pacing = rechtsatriale Schrittmacherstimulation. Kontrolle n=7; IPoc n=6; CsA i.v. n=6; CsA Retroinfusion n=5. MEAN \pm SEM, *p<0,05

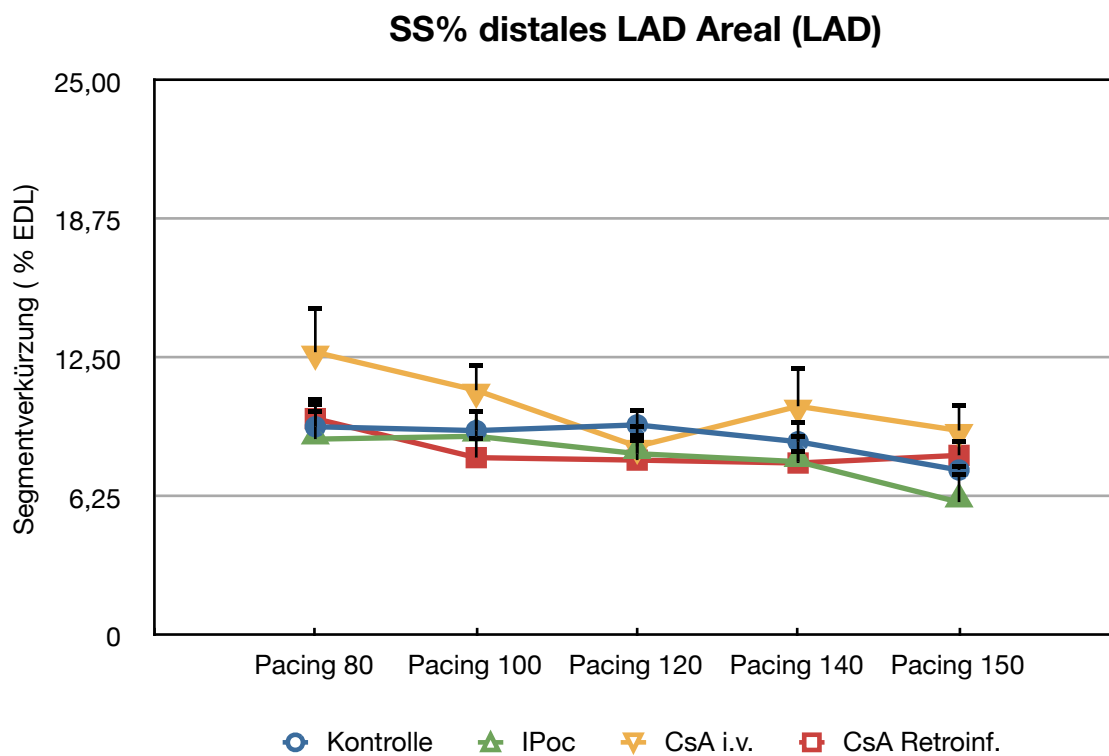


Abb. 37: Regionale Myokardfunktion im LAD- Bereich. Segmentverkürzung in % der enddiastolischen Länge. Pacing = rechtsatriale Schrittmacherstimulation. Kontrolle n=7; IPoc n=6; CsA i.v. n=6; CsA Retroinfusion n=5. MEAN \pm SEM.

4.5. Ciclosporinbestimmungen Blut

Zum Vergleich der Effektivität der beiden Applikationsformen des CsA-systemisch intravenös versus retrograd koronarvenös - wurden in diesen beiden Gruppen zu bestimmten Zeitpunkten arterielle und venöse Blutproben entnommen. Nach direkter koronarvenöser Applikation zeigten sich erwartungsgemäß unmittelbar nach CsA Gabe signifikant höhere Spiegel in den Koronarvenen (rote Kurve), im Vergleich zur systemischen CsA Gabe im peripheren Blut (blaue Kurve), z.B. 2 min nach Ischämie: CsA Retroinf. ven. $8099 \pm 1753,12$ vs. CsA i.v. art. $3220 \pm 445,93$ # $p=0,052$; oder nach 10 min Ischämie: CsA Retroinf. venös $4873 \pm 608,80$ vs. CsA i.v. venös $2951 \pm 415,77$ * $p<0,05$; oder selbst nach 30 min Ischämie: CsA Retroinf. venös $3247 \pm 300,61$ vs. CsA i.v. venös $2041 \pm 147,98$; * $p<0,05$. (Alle Werte in ng/ml)

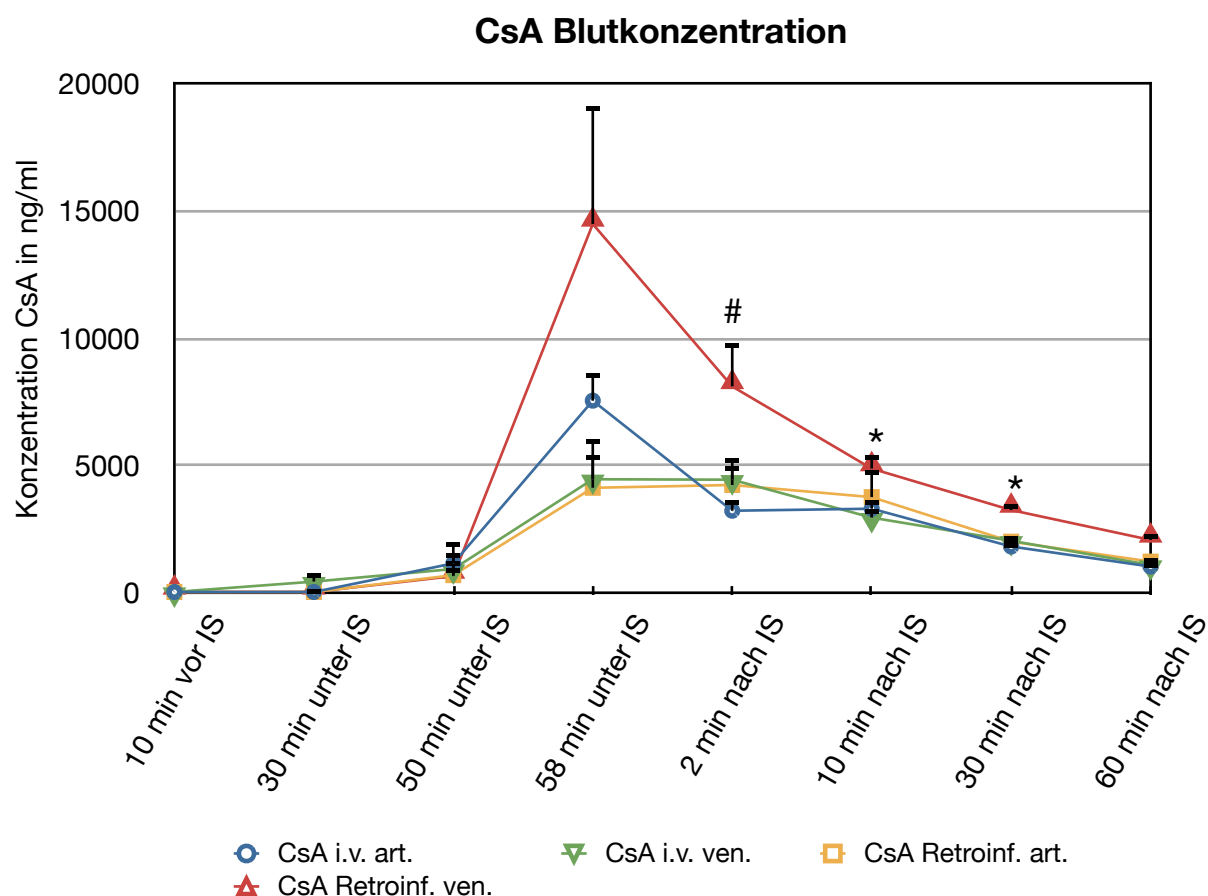


Abb. 38: Blutkonzentration CsA zu den angegebenen Zeitpunkten, dargestellt für beide CsA Interventionsgruppen. MEAN, \pm SEM, # $p=0,05$; * $p<0,05$. CsA i.v. arteriell $n=5$; CsA i.v. venös $n=4$, CsA Retroinfusion arteriell $n=7$; CsA Retroinfusion venös $n=6$

4.6. Intramyokardiale CsA-Bestimmung LC-Tandem MS

Die Bestimmungen der intramyokardialen CsA Konzentrationen in nmol/g fand in den Gruppen mit systemischer CsA Applikation (n=6, LAD und AAR jeweils Slice 1 und 4) und retrograder CsA - Infusion (n=6, LAD,AAR und RCX jeweils Slice 1 und 4) statt. Die Abb. 39 zeigt dabei den direkten Vergleich der Konzentrationen zwischen systemischer CsA i.v. - Applikation und Retroinfusion für die einzelnen Schnitte und Gebiete. Hierbei ist zu sehen, dass vor allem in den Zielarealen LAD 1 und LAD 4 durch die Retroinfusion höhere CsA - Gewebespiegel im Vergleich zur systemischen Infusion erzielt werden konnten (LAD1 CsA i.v. $7,12 \pm 1,64$ vs. CsA Retroinfusion $34,25 \pm 9,72$ nmol/g, $p=0,05$; LAD 4 CsA i.v. $19,39 \pm 5,43$ vs. CsA Retroinfusion $75,45 \pm 26,21$ nmol/g, $p=0,1$).

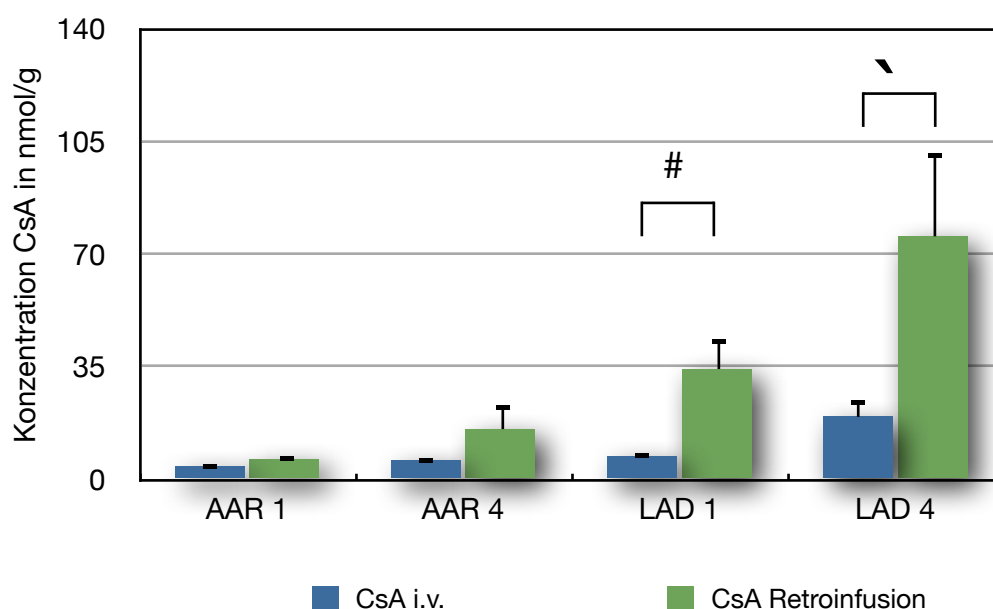


Abb. 39: Intramyokardiale Gewebekonzentration von CsA i.v. vs. Retroinfusion in nmol/g. Vergleich von Applikationsart, sowie der unterschiedlichen Slices. n=6/Gruppe, MEAN, \pm SEM, # $p=0,05$; * $p=0,1$

In Abb. 40 sind die Gewebespiegel von CsA nur für die Retroinfusion aufgetragen. Da CsA über die AIV im Infarktgebiet (LAD>AAR) angereichert wird, war anzunehmen, dass dort höhere CsA-Gewebespiegel als im RCX-Areal herrschen. (CsA Retroinfusion LAD1 $34,25 \pm 9,72$ vs. RCX1 $5,99 \pm 0,93$, $p<0,05$; LAD4 $75,45 \pm 26,21$ vs. RCX1 $5,99 \pm 0,93$, $p=0,06$ n.s.). Zudem fällt auf, dass insgesamt die Spiegel im Kernbereich des Infarkts (LAD) gegenüber der Area at risk höher sind

(LAD1 $34,25 \pm 9,72$ vs. AAR1 $6,16 \pm 0,94$, $p < 0,05$; LAD4 $75,45 \pm 26,21$ vs. AAR1 $6,16 \pm 0,94$ $p = 0,06$ n.s., alles in nmol/g).

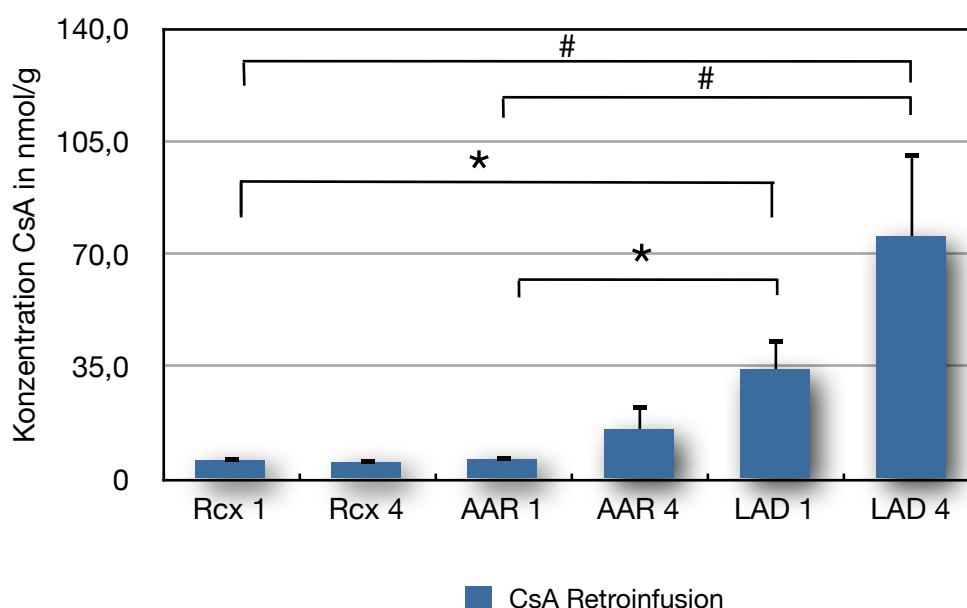


Abb. 40: Intramyokardiale Gewebekonzentration von CsA nach Retroinfusion. Vergleich der Konzentrationen der einzelnen Slices. $n=6/\text{Gruppe}$, MEAN, \pm SEM, * $p < 0,05$; # $p = 0,06$

4.7. Western Blot RISK-Pathway

Proteine des Reperfusion Injury Salvage Kinase - Pathways nehmen eine zentrale Stellung im Rahmen der Verhinderung des Reperfusionsschadens ein. Hierbei sind vor allem die phosphorylierten(p) Formen von AKT, GSK3 β und ERK1/2 von Bedeutung. Im Schweinemodell wird die Einflussnahme von IPoc auf den RISK-Pathway und damit auch der Einfluss auf den Reperfusionsschaden kontrovers diskutiert [99, 112]. In unserem Modell haben wir die Proteine AKT/pAKT, GSK3 β /pGSK3 β und ERK1/2/pERK1/2 per Western Blot untersucht. Durch die Wahl eines „closed chest“-experimentellen Modells war die Möglichkeit einer myokardialen Probenentnahme während Ischämie und Reperfusion ausgeschlossen. Die im Western Blot untersuchten Proteine stellen somit nur eine Momentaufnahme am Tag 2 nach 24h Reperfusion dar und können keine zeitlichen Aufschlüsse über die Phosphorylierung, oder die Baseline an Proteinen vor Ischämie liefern.

Alle Werte sind in ODu/mm² als Dichte angegeben.

In Bezug auf AKT gab es zwischen Kontroll- und IPoc-Gruppe keine signifikanten Unterschiede (siehe Abb. 41): Kontrolle $4,4 \pm 0,52$ vs. IPoc $4,29 \pm 0,39$ ODu/mm². Auch bezogen auf pAKT gab es unter den Gruppen keine signifikanten Unterschiede: Kontrolle $3,82 \pm 0,22$ vs. $3,78 \pm 0,36$ ODu/mm². Ebenfalls nicht signifikant waren der Unterschied zwischen AKT und pAKT in beiden Gruppen.

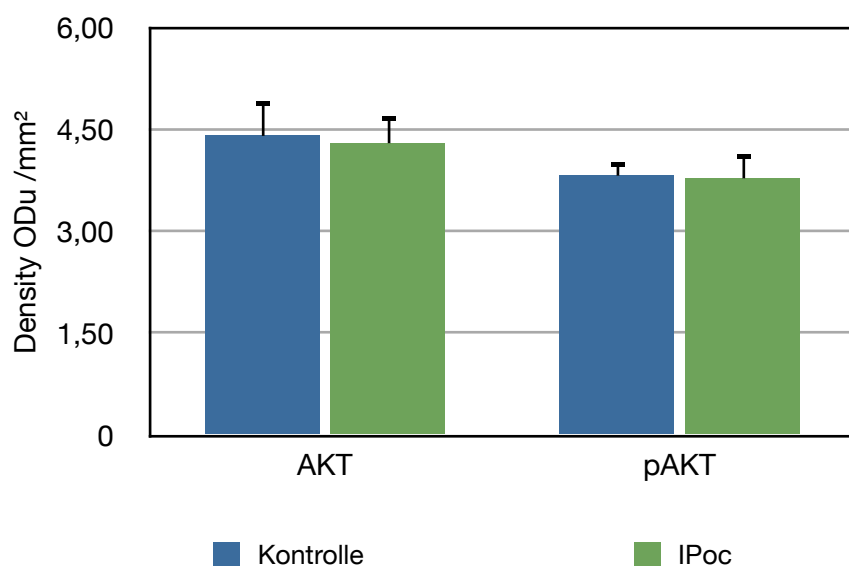


Abb. 41 : Graphische Auswertung Western Blot AKT - pAKT für Kontroll- (n=4) und IPoc-Tiere (n=5). MEAN, ± SEM.

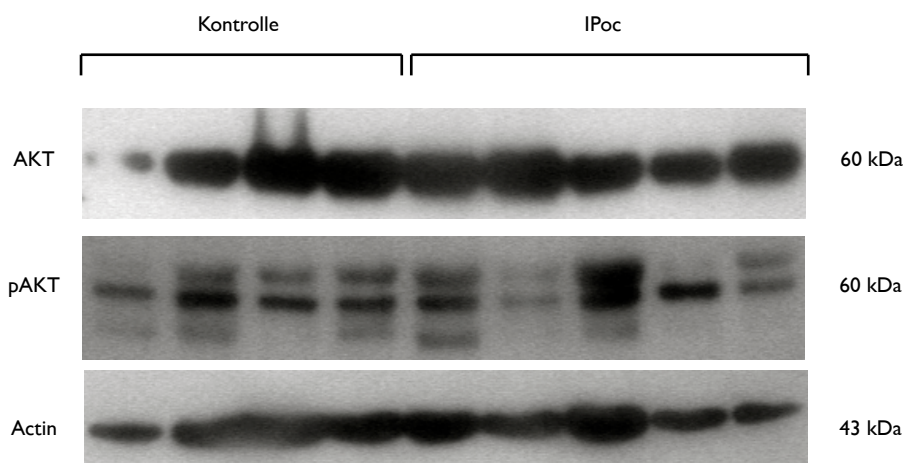


Abb. 42: Western Blot AKT - pAKT, sowie Actin als interne Kontrolle

pGSK3 β in der Kontrollgruppe ist signifikant geringer zu GSK3 β (siehe Abb. 43): Kontrolle GSK3 β $3,65 \pm 0,14$ vs. Kontrolle pGSK3 β $3,10 \pm 0,08$ ODu/mm², $p < 0,05$. Ansonsten waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen zu vermerken.

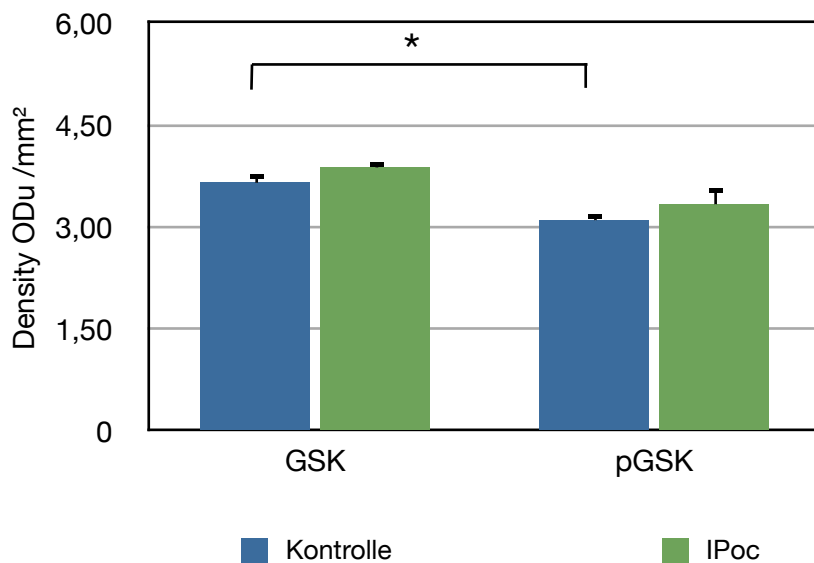


Abb. 43: Graphische Auswertung Western Blot GSK3 β - pGSK3 β für Kontroll- (n=4) und IPoc-Tiere (n=5). MEAN, \pm SEM, *p<0,05

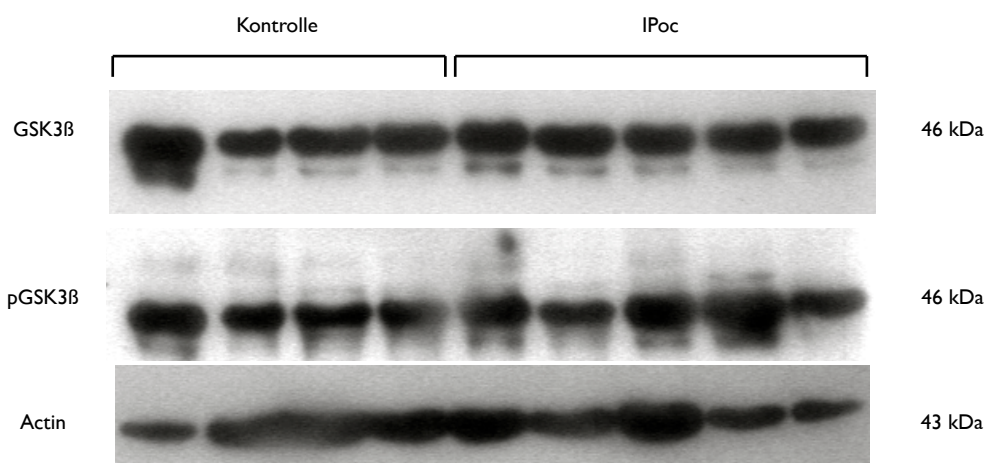


Abb. 44: Western Blot GSK3 β - pGSK3 β , sowie Actin als interne Kontrolle

In der Auswertung des Western Blots der ERK1/2 / pERK1/2 (siehe Abb. 45) kamen folgenden signifikanten Unterschiede zu Tage:

In der Kontrollgruppe waren pERK1/2 im Vergleich zu ERK1/2 signifikant erhöht: Kontrolle ERK1/2 $3,59 \pm 0,21$ vs. Kontrolle pERK1/2 $5,2 \pm 0,34$ ODu/mm², p<0,05. In der IPoc Gruppe war pERK 1/2 dagegen signifikant niedriger als ERK1/2: IPoc ERK1/2 $3,04 \pm 0,17$ vs. IPoc pERK1/2 $1,96 \pm 0,30$ ODu/mm², p<0,05. Auch gab es einen signifikanten Unterschied zwischen den Kontroll- und IPoc-Gruppe bezüglich der phosphorylierten ERK1/2, wobei in der Kontrollgruppe pERK1/2 signifikant mehr

nachzuweisen war: Kontrolle pERK1/2 $5,2 \pm 0,34$ vs. IPoc pERK1/2 $1,96 \pm 0,30$ ODu/mm², $p < 0,05$.

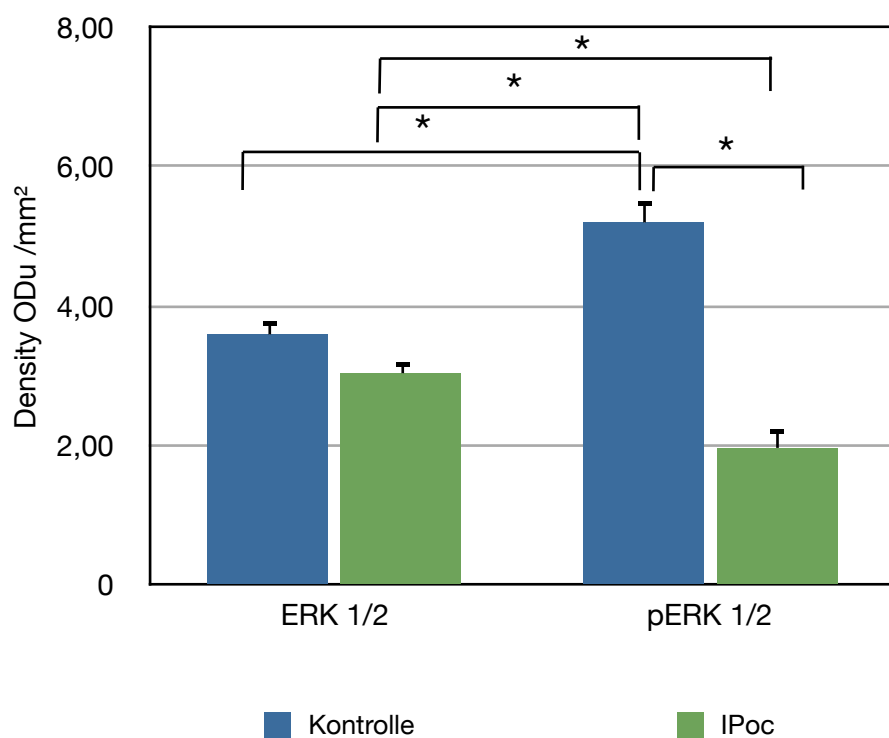


Abb. 45: Graphische Auswertung Western Blot ERK1/2 - pERK1/2 für Kontroll- (n=4) und IPoc-Tiere (n=5). MEAN, \pm SEM, * $p < 0,05$

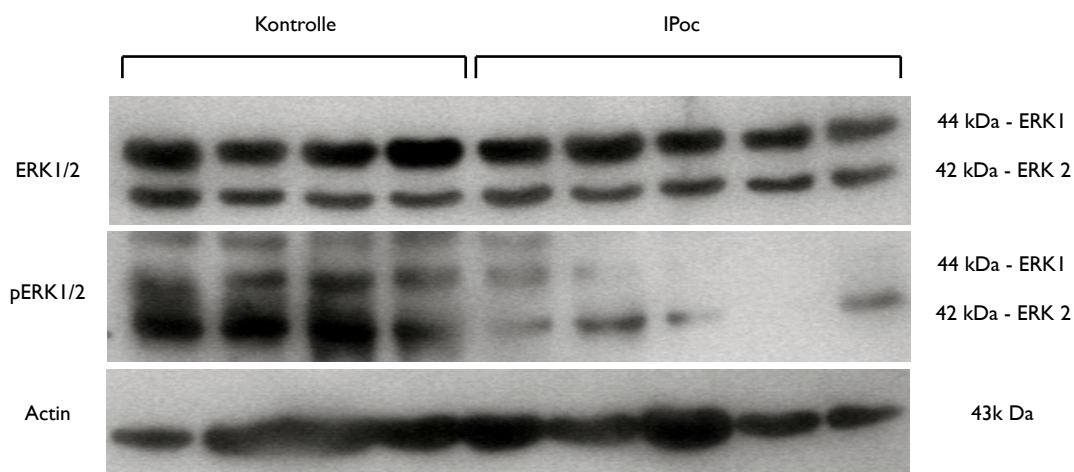


Abb. 46: Western Blot ERK1/2 - pERK1/2, sowie Actin als interne Kontrolle

4.8. Kardiospezifische sowie allgemeine Ischämie marker: CK, Trop I, LDH, GOT, GPT

Durch die Gewebenekrose im infarzierten Myokard werden bestimmte Enzyme in den Blutkreislauf freigesetzt. Hierzu gehören beim Schwein, genauso wie auch beim Menschen als direkte Myokardmarker Troponin I oder T und Creatinkinase MB (CKMB). Zusätzlich wurden die unspezifischen Ischämie marker GPT, GOT, LDH und CK Gesamt bestimmt. Die Serumspiegel dieser Ischämie marker wurden vor und nach Intervention bestimmt.

a) spezifische Myokardmarker: Da ein Assay für porcine CK-MB nicht kommerziell erhältlich ist, wurde sich auf das kardiospezifische Troponin I beschränkt. Präinterventionell lagen die Troponin I Werte in allen Gruppen am unteren Detektionslimit. Nach Infarktinduktion und Reperfusion kam es in allen Therapiegruppen zum Troponinanstieg (siehe Abb. 47): z.B. Kontrolle Tag 1 $0,33 \pm 0,15$ vs. Tag 2 $74,26 \pm 7,55$ ng/ml $p < 0,05$. Dagegen waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen am Tag 2 zu sehen: Tag 2 Kontrolle $74,26 \pm 7,6$ vs. IPoc $84,56 \pm 16,11$; vs. CsA $74,55 \pm 10,27$; vs. CsA Retroinf. $104,24 \pm 29,17$ ng/ml (alle n.s.).

b) globale Ischämie marker (Gesamt CK, GOT, GPT und LDH): zeigten einen ähnlichen Anstieg von Tag 1 auf Tag 2, welcher in allen Gruppen bis auf die Gruppe CsA Retroinfusion, signifikant war (siehe Abb.48-51).

Es bestanden weder bezüglich der spezifischen, noch der globalen Ischämie marker signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Therapie-Gruppen am Tag 2. Auffällig ist jedoch für alle Enzyme ein im Vergleich zu den anderen Gruppen höherer Anstieg in der Gruppe CsA Retroinfusion.

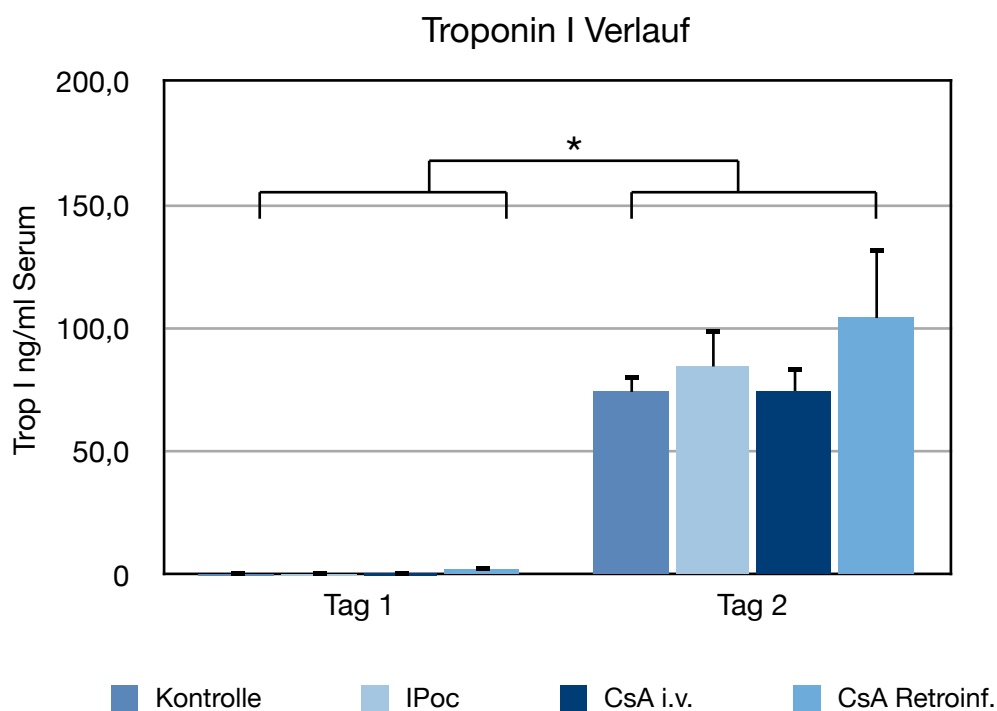


Abb. 47: Serumkonzentration Troponin I in ng/ml Serum, gemessen am Tag 1 vor Ischämie, am Tag 2 nach 24h Reperfusion. MEAN,± SEM,* $p < 0,05$. Kontrolle $n=7$; IPoc $n=7$; CsA i.v. $n=4$; CsA Retroinfusion $n=5$.

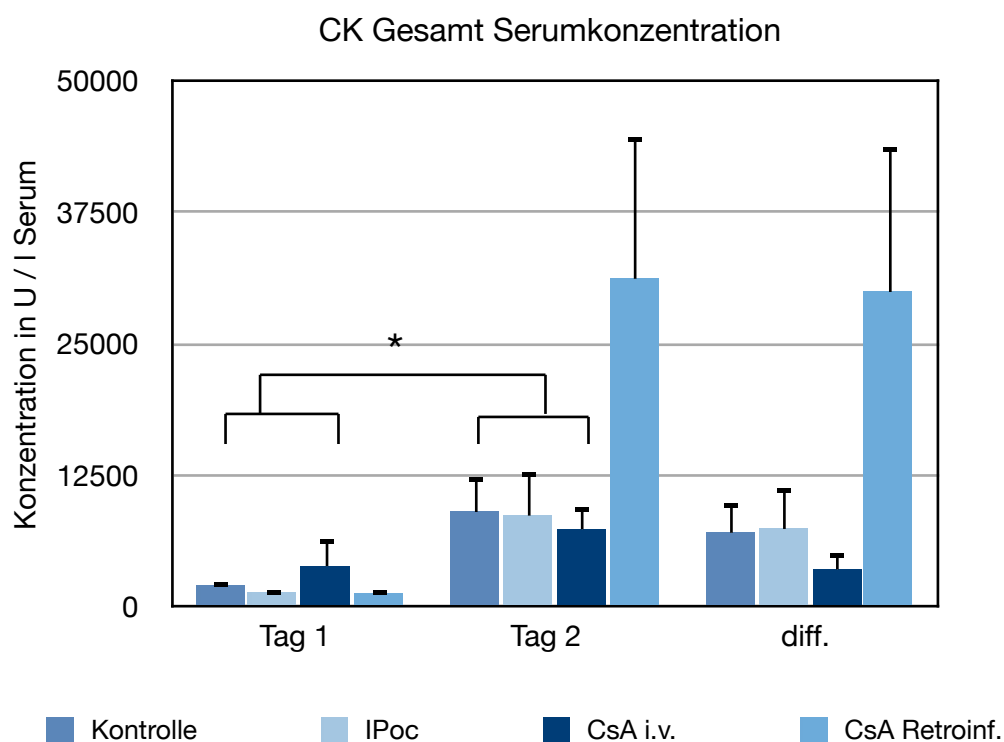


Abb. 48: Serumkonzentration Creatinkinase in U/l Serum, gemessen am Tag 1 vor Ischämie, am Tag 2 nach 24h Reperfusion und die Differenz zwischen Tag 1 und 2. MEAN,± SEM. Kontrolle $n=7$; IPoc $n=7$; CsA i.v. $n=4$; CsA Retroinfusion $n=5$.

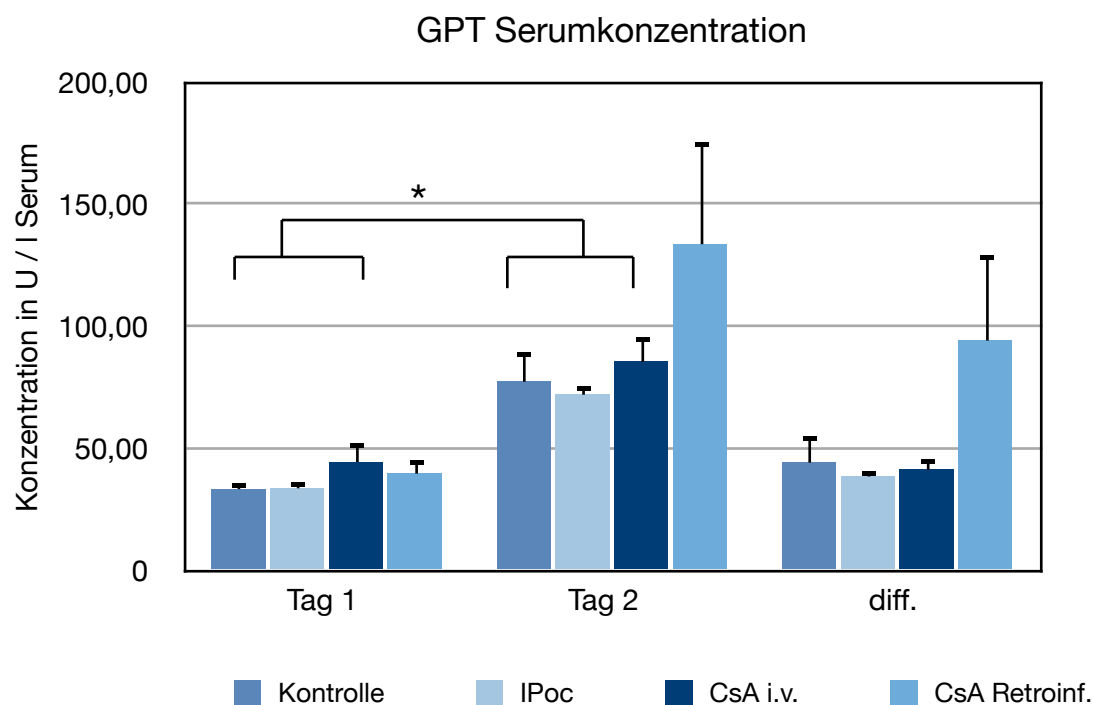


Abb. 49: Serumkonzentration GPT in U/l Serum, gemessen am Tag 1 vor Ischämie, am Tag 2 nach 24h Reperfusion und die Differenz zwischen Tag 1 und 2. MEAN, \pm SEM, * $p < 0,05$. Kontrolle $n=7$; IPoc $n=6$; CsA i.v. $n=4$; CsA Retroinfusion $n=2$

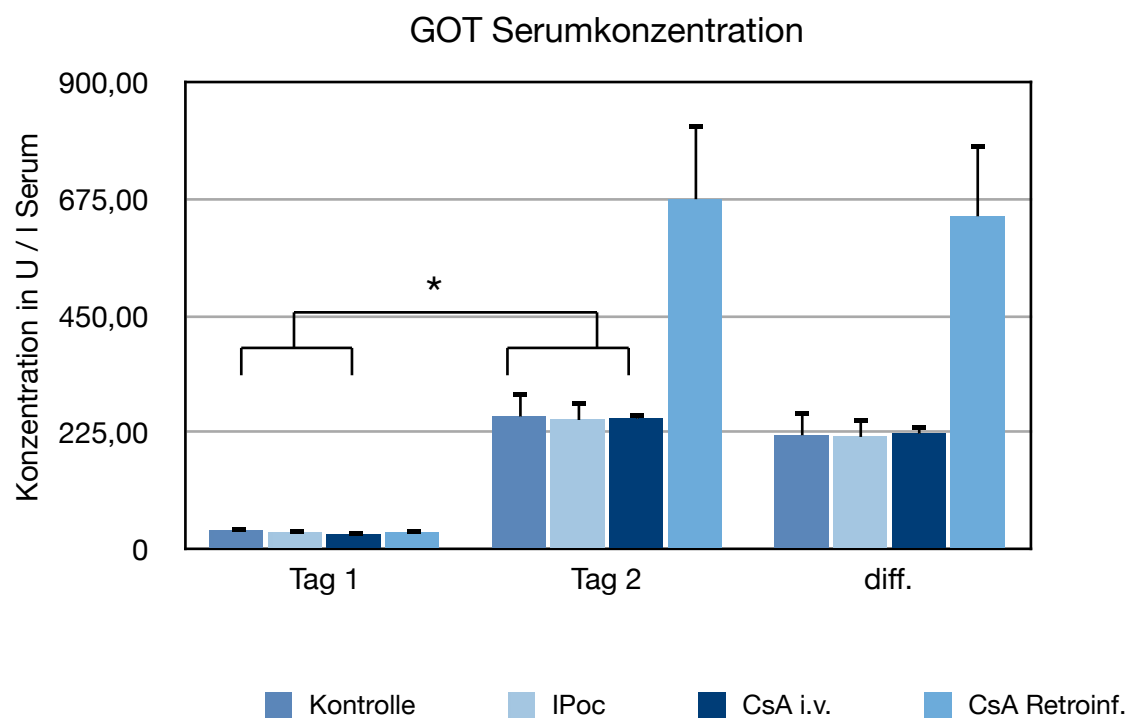
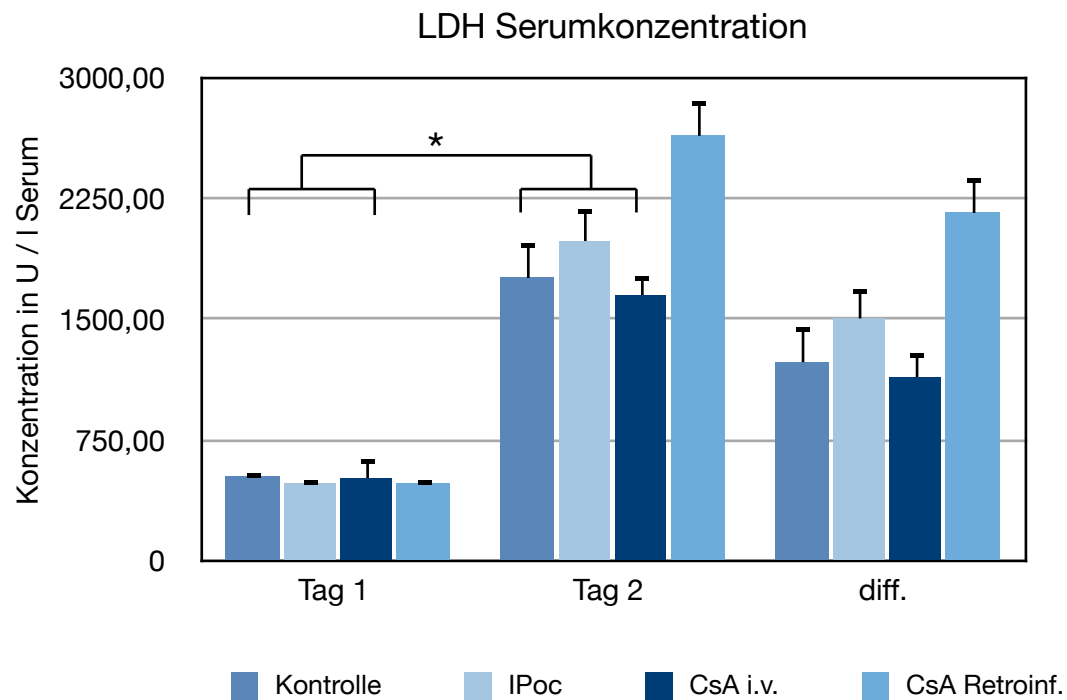


Abb. 50: Serumkonzentration GOT in U/l Serum, gemessen am Tag 1 vor Ischämie, am Tag 2 nach 24h Reperfusion und die Differenz zwischen Tag 1 und 2. MEAN, \pm SEM, * $p < 0,05$. Kontrolle $n=7$; IPoc $n=6$; CsA i.v. $n=4$; CsA Retroinfusion $n=2$



*Abb. 51: Serumkonzentration LDH in U/l Serum, gemessen am Tag 1 vor Ischämie, am Tag 2 nach 24h Reperfusion und die Differenz zwischen Tag 1 und 2. MEAN, ± SEM, * $p < 0,05$. Kontrolle $n=7$; IPoc $n=6$; CsA i.v. $n=4$; CsA Retroinfusion $n=2$*

5. Diskussion

5.1. Allgemeines

In den letzten Jahrzehnten rückt die Therapie des Reperfusionsschadens immer weiter in den Focus der kardiovaskulären Grundlagen- und klinischen Forschung. Das bessere Verständnis der molekularen Abläufe während Ischämie und Reperfusion ermöglicht, die Entwicklung des Reperfusionsschadens gezielt anzugehen und dessen Entstehung zu verhindern. Pharmakologische Substanzen können Mediatoren des Reperfusionsschadens blockieren. Zudem stehen mit der Ischämischen Prä-, und Postkonditionierung, sowie mit dem „Remote Preconditioning“ eine Reihe von klinisch anwendbaren interventionellen Therapieformen bereit, den Reperfusionsschaden alltagsnah anzugehen. Nicht zuletzt hat die experimentelle Anwendung dieser Therapieformen zum weiteren Verständnis der Mechanismen des Reperfusionsschadens geführt.

Im Zentrum der Bemühungen steht aktuell die Inhibition der Öffnung der mPTP während der Reperfusion. In der frühen Reperusionsphase öffnet die mPTP und führt zur Destabilisierung des Membranpotentials des Mitochondriums, zur Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung und letzten Endes auch zur Apoptose der Zelle. CsA gilt als Inhibitor der mPTP via Bindung an Cyclophilin D. CsA kann zusätzlich an andere Cyclophiline binden und darüber wirken. Desweiteren gelten die ischämische Prä- und Postkonditionierung als potente Inhibitoren der mPTP während der Reperusionsphase und als Aktivatoren kardioprotektiver Signalkaskaden. Dies wurde in verschiedensten tierexperimentellen Studien (einschliesslich Zellen, Mäusen, Ratten, Kaninchen und Schweinen) und zuzüglich am Menschen belegt.

Dennoch existieren Veröffentlichungen, die diesen Effekt anzweifeln. Auf der einen Seite bestehen tierexperimentelle Studien nicht vorerkrankter Tiere, bei denen Ischämische Postkonditionierung und CsA-Applikation nicht den erwünschten Effekt zeigten. Auf der anderen Seite kommen jetzt erst Tier-Modelle zum Einsatz, bei denen Tiere Komorbiditäten, wie z.B. einen Diabetes Mellitus aufweisen und die Effekte der Therapieformen neu eingeschätzt werden müssen ^[162].

Der herzkranke, ältere Patient präsentiert sich allgemein mit mehreren Komorbiditäten, die Einfluss auf den Reperfusionsschaden und die Effektivität der hier vorgestellten Therapiemöglichkeiten haben können ^[114, 160, 163]. Hier seien vor

allem Erkrankungen wie Hypercholesterinämie, Diabetes, Adipositas, arterieller Hypertonus und linksventrikuläre Hypertrophie genannt, die den Effekt der Postkonditionierung einschränken können [163]. Hohes Alter an sich scheint ebenfalls einen negativen Einfluss auf die Effektivität der Therapie zu haben. So können sowohl ischämische Postkonditionierung, als auch CsA-Therapie im Alter im Tierexperiment wirkungslos sein [114, 164].

Der Effekt der Ischämischen Postkonditionierung ist abhängig von der Dauer der Ischämie und dem angewandten Postkonditionierungs - Algorithmus. So haben z.B. Iliodromitis et al. [88] andere Protokolle anwenden müssen, um einen therapeutischen Effekt zu erlangen. Eine Übersichtsarbeit von Skyschally et al. [87] summiert die angewandten Ischämie/Reperfusions-Protokolle, sowie den durchgeführten Postkonditionierungszyklus und den Effekt auf die Infarktgröße.

Auch bei der Anwendung von CsA gibt es Einschränkungen und Zweifel ob des möglichen Schutzes. So haben Karlsson et al. zeigen können, dass verschiedene CsA-Konzentrationen im Ischämie-Reperfusions-Modell am Schwein keine Wirkung auf die Reduktion des Infarkts haben [129, 130].

Das hiermit vorgestellte Modell soll einen Beitrag in dieser Thematik leisten. Es sollte die Effektivität eines bereits bekannten Postkonditionierungsalgorithmus für ein noch nicht eingesetztes Ischämiemodell (60 min, 24h Reperfusion) untersucht werden. Der Postkonditionierungs-Algorithmus 6 x 20/20s Reperfusion/Ischämie wurde in Anlehnung an die Arbeitsgruppe Heusch et al. gewählt. Diese Gruppe arbeitet mit einem unterschiedlichen Ischämie/Reperfusions-Modell (90 min Ischämie, 2 h Reperfusion). Der Ischämie/Reperfusions-Schaden wird hier an einem low-flow open chest Modell untersucht [112]. Auf Grund der Durchführung von 24 h Reperfusion in unserem Modell, haben wir uns für ein „closed-chest“-Modell entschieden. Die Sternotomie wurde erst am Tag 2 der Experimente durchgeführt.

Desweiteren wurde in der hier vorgestellten Studie untersucht, wie effektiv CsA in unserem Ischämie-/Reperfusionsmodell wirkt. Der systemischen (i.v.) CsA-Applikation wurde hierbei eine retrograde koronarvenöse Infusion mit CsA der gleichen Konzentration (5mg/kg KG) gegenüber gestellt. Das retrograde Einbringen von Medikamenten und Genvektoren in das koronarvenöse System kann zur Konzentrationssteigerung und zur besseren Bioverfügbarkeit im Infarkt- und Area at risk-Bereich genutzt werden.

Es wurde eine Konzentration von 5mg/kg KG CsA gewählt, da sie einen Mittelweg zwischen dem in kleineren tierexperimentellen (10mg/kg/KG) Modellen und beim Menschen angewendeten Dosis (2,5mg/kg/KG), darstellt. CsA wurde bewusst 10min vor der Reperfusionsphase verabreicht, damit zum Zeitpunkt der Reperfusion eine ausreichende Konzentration im Kreislaufsystem verfügbar war.

Die Tiere wiesen unserer Kenntnis nach keine der genannten Komorbiditäten auf, die zu einer Beeinflussung der Experimente hätte führen können.

5.2. IPoc

Der von uns angewandte Postkonditionierungs-Algorithmus von alternierend 6 x 20/20s Reperfusion/Ischämie war in unserem Modell nicht in der Lage eine signifikante Infarktgrößenreduktion im Vergleich zur Kontrolle zu erzielen. (→Abb. 24+25) Gleichermäßen konnte die Akkumulation von PMN im AAR- und Infarktgebiet nicht reduziert werden. (→Abb. 28+29) Auch waren keine Unterschiede bezüglich der globalen und regionalen myokardialen Funktion zur Kontrolle beobachtet worden. (→Abb. 30-33; 35-37) Einzig war die linksventrikuläre Relaxation in der Diastole bei pacing 140 und pacing 150 im Vergleich zur Kontrolle signifikant besser. (→Abb. 34) Die Ergebnisse könnte man dahingehend interpretieren, dass der Postkonditionierungsstimulus für unser Modell zu gering, bzw. das I/R-Modell zu hart war. Bezüglich der Infarktgröße und der Akkumulation von PMN, muss berücksichtigt werden, dass in unserem Modell mit 24 h Reperfusion mehr Zeit für die Akkumulation von PMN im Infarktgebiet vorhanden ist. So findet der Großteil der Akkumulation im Rahmen von bis zu 4 h mit einem Peak in der ersten Stunde nach Infarkt statt.^[49, 165] Die Arbeitsgruppe von Heusch et al, die zwar den gleichen IPoc-Algorithmus einsetzt, aber eine anderes I/R-Modell zur Basis hat, kann einen klaren Effekt der Infaktreduktion durch IPoc vorweisen. In ihrem Modell beträgt die Dauer der Reperfusion jedoch nur 120 min, bevor die Entnahme des Herzens zu weiteren Untersuchungen stattfindet. Da die Leukozyteninfiltration mit der Infarktgröße zusammenhängt, ist in diesem Modell auch eine geringere Infarktgröße zu erwarten. In der Tat beträgt die Infarktgröße in dieser Studie nur 33+/-4% Inf/AAR wohingegen bei uns eine Größe von 56,68± 2,2% Inf/AAR in der Kontrollgruppe zu messen war. Zwar ist die Ischämie in diesem Modell länger, jedoch wird eine low-flow - Ischämie durchgeführt. Hiermit soll der Blutfluss durch eine Kollateralversorgung, ähnlich

atherosklerotischer Patienten, simuliert werden. Wenngleich Heusch et al damit das der Klinik nähere Modell vorstellen, so berücksichtigt unser Modell die maximale Schädigung ohne Kollateralfloss. Lagranha et al konnten ebenso wie in dem hier gezeigten Modell keine Reduktion der Infarktgröße durch Ischämische Postkonditionierung zeigen. Allerdings wurde in diesen Untersuchungen eine vermehrte Phosphorylierung der RISK-Proteine aufgezeigt [99]. Iliodromitis et al vermuteten daher, dass für eine effektive Kardioprotektion nicht nur die Aktivierung des RISK-Pathways wichtig ist, sondern ischämische Postkonditionierung auch auf anderen Wegen wirkt, die mit dem Postkonditionierungsalgorithmus zusammenhängt [88]. In der von Iliodromitis et al. vorgestellten Studie, die die gleiche Ischämiedauer am Schwein wie in unserem Modell benutzt, war der Effekt der Postkonditionierung abhängig vom Algorithmus. So war ein Algorithmus von 4 x 30/30 s nicht effektiv, ein Erhöhung des Algorithmus auf 8 x 30/30s jedoch schon. Leider wurden in dieser Studie nicht die Aktivierung des RISK-Pathways mittels Western Blot untersucht. Im Modell von Iliodromitis wurden die Herzen nach 3 h Reperfusion entnommen und genauer untersucht. Hierbei konnte eine Infarktgröße der Kontrolle von 33.5 ± 7.6 %Inf/AAR gemessen werden. Diese ist im Vergleich zu den von uns vorliegenden Daten deutlich kleiner, was ebenfalls mit der Dauer der Reperfusion zusammenhängen kann.

Für weitere Studien zu unserem Modell, wäre es interessant, andere Postkonditionierungs-Algorithmen zu untersuchen, sowie die Reperfusionszeit zu reduzieren. Dies könnte zu einer besseren Vergleichbarkeit zu anderen Studien führen und Aufschluss geben, ob andere Algorithmen effektiver sind.

Nach 24h Reperfusion wird in unserem Modell eine höhere Infarktgröße verzeichnet, als in einem vergleichbaren Ischämiemodell mit 2 und 3 h Reperfusion [88, 112]. So könnte spekuliert werden, dass andere Studien, die schon nach kurzer Reperfusionszeit das Experiment beenden, nicht das volle Spektrum an Leukozyten-assoziierten Schäden einfangen und in der Analyse der Infarktgröße berücksichtigen können.

5.3. Intervention mit CsA

5.3.1. Systemische Applikation von CsA

Die in unserem Modell applizierte intravenöse CsA Konzentration von 5mg/kg/KG war nicht in der Lage, die Infarktgröße signifikant zu reduzieren. (→Abb. 24+25) Zusammen mit der Retroinfusion konnte im Vergleich zur Kontrolle und IPoc-Interventionsgruppe die größte Infaktreduktion erzielt werden. Auch die Ansammlung von PMN im Infarkt und AAR-Gebiet war bei der systemischen Applikation von CsA im Vergleich am geringsten. (→Abb. 28+29) Die globalen Parameter der Herzfunktion der CsA i.v. Gruppe waren nicht unterschiedlich im Vergleich zu den anderen Gruppen. Einzig die regionale Herzfunktion im Bereich der proximalen LAD (AAR-Bereich) blieb weitestgehend erhalten und zeigte signifikante Unterschiede im Vergleich zur CsA Retroinfusion. (→Abb. 36) Dies deutet darauf hin, dass durch CsA die myokardiale Funktion im Ansatz erhalten werden kann.

Die Messung der kardialen Marker im Serum zeigte keine Unterschiede zwischen der CsA i.v. -Gruppe und anderen Gruppen. (→Abb.47-51)

Weitere Versuche mit anderen Konzentrationen CsA oder der gleichen Konzentration CsA an anderen I/R-Modellen sind wünschenswert, um die Effektivität zu bestimmen.

Heusch et al. stellen ebenfalls ein Ischämie-Reperusionsmodell mit CsA vor. Hier wird das I-R/Modell wie oben beschrieben eingesetzt. Die Applikation von 5 mg/kg CsA i.v. erfolgt hier 5 min vor Ende der Ischämie. CsA konnte hier eine signifikante Infarktgrößenreduktion erzielen.

Im Modell von Karlsson et al. konnte sowohl mit einer Konzentration von 2.5mg/kg/KG, also auch bei 10 mg/kg/KG i.v. und einer Ischämie von 45min und 2h Reperfusion keine Infaktreduktion gezeigt werden. Diese Arbeitsgruppe untersuchte auch das Zusammenspiel zwischen Isofluran und CsA und konnte dabei zeigen, dass beide Pharmaka zusammen gegeben, nicht mehr kardioprotektiv waren.

In Anlehnung an diesen Gedanken, könnte man in unserem Modell ebenfalls Experimente durchführen, die Isofluran und die CsA-Administration voneinander entkoppeln. Dabei sind Rückschlüsse auf eine Interferenz der beiden Pharmaka möglich.

5.3.2. Retroinfusion von CsA

In vorgestellten Modell können wir zeigen, dass mit der Retroinfusion eine höhere koronarvenöse Konzentration von CsA während der Reperfusion erzielt werden kann. (→ Abb. 38) Gerade in den ersten Minuten der Reperfusion, in denen CsA die Öffnung der mPTP entscheidend hindern kann, ist eine gute Verfügbarkeit von CsA essentiell. Ebenso konnten wir beweisen, dass die Retroinfusion von CsA in die AIV zu höheren intramyokardialen Konzentrationen von CsA vor allem im Infarktgebiet führt und dies noch nach 24h Reperfusion nachweisbar ist. (→ Abb. 39+40)

Trotz der höheren Konzentrationen von CsA und damit der höheren Verfügbarkeit zeigten diese Tiere keine signifikante Verbesserung der Infarktgröße. Die Infarktgröße (Inf%AAR und Inf%LV) war zwar im Vergleich zu anderen Gruppen geringer, jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede berechnet werden. (→ Abb. 24+25) Ähnliches gilt für die Akkumulation von Neutrophilen Granulozyten im Infarkt- und AAR-Bereich. Im Infarktgebiet konnte eine Ansammlung von PMN detektiert werden, die geringer als die der Kontroll- und IPoc-Gruppe ist. Jedoch ist auch diese Berechnung im Vergleich nicht signifikant. (→ Abb. 29) Hier ist vor allem eine hohe Standardabweichung der Ergebnisse der einzelnen Tiere zu verzeichnen. Es kann zuletzt nicht ausgeschlossen werden, dass kardiopulmonal vorerkrankte Tiere in den Versuch genommen wurden, die von vornherein eine höhere Anzahl an zirkulierenden Leukozyten aufwiesen, die in der Folge zu einer erhöhten PMN-Anzahl im Infarktgebiet geführt hat. Hier würden eine höhere Tieranzahl pro Gruppe, sowie eine genaue Selektion der Tiere eventuell diesen Effekt beseitigen können. Der geringen Verbesserung der Infarktgröße und der Reduktion PMN Ansammlung stehen die Untersuchungen der kardialen Marker im Serum gegenüber. Die Konzentration aller untersuchten kardialen Enzyme, die bei einem Infarkt freigesetzt werden, war im Vergleich zu allen anderen Gruppen am Tag 2 wenngleich nicht signifikant, höher. Entweder ist hier von einem erhöhten Myokardschaden auszugehen, der sich nicht in der fotografischen Messung der Infarktgröße widerspiegelte; oder es handelt sich um Fehlmessungen, die durch eine Vorschädigung der Tiere, bei z.B. kardiopulmonal vorerkrankten Tieren, zu Stande kommen können. (→ Abb. 47-51)

Ebenso zeigen die Untersuchungen der globalen und regionalen kardialen Funktion der Gruppe CsA Retroinfusion ein schlechtes Outcome. Während die LVEDP am Tag

2 noch ähnlich der in allen anderen Gruppen ist (→Abb. 30), zeigt sich der dp/dt max am Tag 2 drastisch schlechter. (→Abb. 32) Vor allem die regionale Myokardfunktion im Bereich der AAR (signifikant schlechter) weist auf inferiore funktionelle kontraktile Eigenschaften gegenüber allen anderen Gruppen, inklusive der Kontrolle, hin. (→Abb. 36) Toxische Effekte von Cyclosporin A können hier letztlich nicht ausgeschlossen werden.

5.3.3. Überlegungen zur CsA-Therapie

Griffiths et al. ^[166] konnten im I/R-Modell an der Ratte zeigen, dass der Effekt von CsA auf die Funktionalität der mPTP abhängig von der angewandten Konzentration ist. Geringe Konzentrationen CsA (0.2 mmol/L) hemmen hier die Pore effektiv und garantieren eine normale ATP/ADP -Ratio. Bei der Anwendung höherer CsA-Konzentrationen um 1 mmol/L fehlt dieser Effekt, was für eine ineffektive Hemmung der Pore spricht. Auf Grund des hier benutzten „closed-chest“-Modells konnten keine Myokardproben kurz nach Einleitung der Reperfusion oder innerhalb von 24h entnommen werden. Dadurch war es uns nicht möglich, die mPTP in diesem Zeitfenster zu untersuchen und einen Vergleich zwischen der Hemmung durch CsA 5mg/kg/KG i.v. und Retroinfusion zu ziehen.

CsA hat neben dem bekannten Mechanismus der Inhibition der mPTP auch andere Effekte in Zellen, die eventuell einen Einfluss auf die Infarktentscheidung haben können:

Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass CsA im Stande ist, den hypoxic inducible factor 1 α (HIF-1 α) zu destabilisieren ^[167]. HIF-1 α kumuliert normalerweise in hypoxischen Zellen und dient als Transkriptionsfaktor zur Induktion mehrerer Hypoxie-bedingter Gene. CsA kann diese Gentranskription hemmen, was zu einer verminderten Reagibilität der Zelle auf die Hypoxie führt. Fraglich ist jedoch, wie groß der mögliche Anteil eines solchen Effektes in unserem Modell sein könnte, da CsA 10 min vor Ende der Ischämie gegeben wurde.

CsA ist im Stande an mehrere Cyclophiline in der Zelle zu binden. Hierzu gehört nicht nur die Bindung an Cyclophilin D, worüber die Hemmung der mPTP vermittelt wird, sondern auch die Bindung an Cyclophilin A, worüber Calcineurin inaktiviert wird. Calcineurin, wenn nicht gehemmt, aktiviert NFAT und führt zur Transkription mehrerer

Gene. Unter anderem gehören hierzu auch Gene, die eine kardiale Hypertrophie induzieren können. Zusätzlich kommt es durch NFAT zur Aktivierung von antiapoptotisch wirksamen Proteinen, wie z.B. Bcl-2 and COX-2 ^[168]. CsA kann die Transkription solcher antiapoptotischer Proteine hemmen und so zu einem verminderten Resistenz der Zelle vor Ischämie/Reperfusionsschäden führen. Wie groß dieser Effekt ist und ob er den Effekt der Inhibition der mPTP aufheben könnte, ist nicht geklärt. Untersuchungen von Bcl-2 und COX-2 in allen Gruppen unserer Arbeit hätten nähere Informationen über die Rolle von Calcineurin im Rahmen von Ischämie/Reperfusionsschäden geben können.

Ausserdem konnte gezeigt werden, dass Cyclophilin A eine Rolle bezüglich der Protektion der Zelle vor oxidativem Stress, spielen kann ^[169]. Inwiefern CsA jedoch diese Fähigkeit von Cyp A beeinträchtigen kann, ist bisher nicht untersucht

In weiteren Studien zur Inhibition sollten weitere Pharmaka neben CsA eingesetzt werden, deren Wirkung sich auf die Bindung von Cyclophilin D beschränkt. Unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich derzeit mit dem Einsatz von Sanghlifehrin A zur Inhibition der mPTP im gleichen tierexperimentellen Modell. Ebenso werden in einer zukünftigen Studie die Effekt von CsA und IPoc, wenn kombiniert angewandt, untersucht. Der Effekt der Modulation des Reperusionsflusses soll so mit einer direkten Inhibition der mPTP kombiniert werden.

Wir sind die erste Arbeitsgruppe, die versucht hat, eine Retroinfusion von CsA 5mg/kg/KG im akuten Ischämie/Reperusions-Modell am Schwein durchzuführen. Die Ergebnisse zeigen auf den Infarkt bezogen eine mögliche, wenngleich nicht signifikante Reduzierung, jedoch eine Verschlechterung der globalen und regionalen myokardialen Funktion. Weitere Untersuchungen, vor allem mit anderen Konzentrationen an CsA sind abzuwarten. Ebenfalls müssten die zellulären myokardialen und endothelialen Targets von CsA untersucht werden, um ein besseres Verständnis der Wirkung und der Nebenwirkung von CsA zu erlangen.

5.4. Proteine

Der Effekt auf die Infarktgrößenreduktion wird bei der Ischämischen Postkonditionierung durch die Aktivierung der Signalkaskaden RISK- und SAFE getriggert. In unserer Studie haben wir Teile der Proteine des RISK-Pathways und

ihren Zustand mittels Western Blot untersucht. Der Großteil der vorliegenden Studien, inklusive Versuchen an menschlichen Trabekel-Muskulatur ^[100] geht davon aus, dass es über die Postkonditionierung zu einer Aktivierung von PI3-AKT und ERK1/2 mittels Phosphorylierung kommt. Diese Aktivierung führt zur Beeinflussung weiterer Proteine wie zum Beispiel GSK3 β . GSK3 β ist in seiner phosphorylierten Form gehemmt. Dies verhindert im weiteren Verlauf die Öffnung der mPTP in der Reperfusion. Einige erheben jedoch Zweifel an einer Proteinaktivierung (RISK) bzw. am Effekt von RISK ^[99, 112]. Wir haben die Proteine AKT, GSK3 β und ERK1/2 und ihre jeweils phosphorylierte Form in der Kontroll-, und IPoc-Gruppe am Tag 2 untersucht. Hierbei fiel auf, dass AKT in Kontroll- und IPoc-Gruppe nicht vermehrt phosphoryliert war. (→Abb. 41) ERK1/2 lag in der Kontrollgruppe vermehrt in phosphorylierter Form vor, wohingegen in der IPoc-Gruppe die phosphorylierte Form sogar geringer vorhanden als die unphosphorylierte Form war. (→Abb. 45) Die phosphorylierte Form von GSK3 β war in beiden Gruppen geringer vorhanden als die unphosphorylierte Form. (→Abb. 43)

Die Ergebnisse der Western Blots, so wie sie uns vorlagen, sind in sich nicht schlüssig. Es kann davon ausgegangen werden, dass es im Rahmen der Experimente zu einer Phosphorylierung von ERK1/2 gekommen ist, jedoch nicht zu einer vergleichbaren Phosphorylierung von GSK3 β und AKT. Am ehesten liegt eine akzidentielle Aktivierung von ERK1/2 in der Kontrollgruppe vor. Ein Einfluss von Propofol und Isofluran kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

5.5. Anmerkungen zum präklinischen tierexperimentellen Modell am Schwein

Unser „closed-chest“ Ischämie-Modell von 60 Minuten Länge durch eine Katheter-basierte Okklusion der LAD ist seit mehreren Veröffentlichungen etabliert ^[143, 156]. Dem Modell fehlt es an Möglichkeiten, akute molekulare Veränderungen direkt nach der Ischämie im Herzen, durch Entnahme von Proben, zu detektieren. Hierfür wäre das „open-chest“ Modell oder das in-situ-Herzmodell geeigneter ^[112, 170]. Im Vergleich zu anderen Arbeitsgruppen, die sich mit dem Reperfusionsschaden am experimentellen Schweinmodell beschäftigen, benutzt unsere Gruppe eine längere Reperfusionszeit von 24h. Dies ermöglicht eine maximale Akkumulation von Neutrophilen Granulozyten im geschädigten Bereich. Da die Infarktgröße visuell

ausgewertet wird und die visuelle Bemessung von der Infiltration durch Neutrophile Granulozyten abhängt, ist die Dauer der Reperfusion von Bedeutung.

Generell wurde bei der chirurgischen Präparation in den Versuchen auf minimalste Traumatisierung und Blutverlust geachtet. Dennoch lässt es sich nicht ausschliessen, dass chirurgische Manipulation und Katheter-Intervention, sowie Blutverlust einen beeinflussenden Effekt auf die Experimente haben können.

5.6. Übertragbarkeit der Erkenntnisse auf den menschlichen Organismus

Vieles spricht dafür, die Erkenntnisse des Schweinemodells auf den Menschen übertragen zu können: Koronar- und Herzanatomie mit koronarem Blutfluss in Ischämie und Reperfusion, Herzphysiologie ^[171], Herzgröße und Infarktentstehung sind ähnlich ^[170]. Alle kardioprotektiven Phänomene wie Ischämische Präkonditionierung ^[172, 173] / Postkonditionierung ^[87, 88, 112, 174] und „Remote conditioning“ ^[175] konnten im Schweinemodell, sowie am Menschen beobachtet werden. Hinzu kommt auch der Nachweis der Effektivität von CsA als pharmakologische Postkonditionierung ^[64, 128, 176]. Dennoch gibt es entscheidende Unterschiede der meisten und des hier vorgestellten experimentellen Modells im Vergleich zum Menschen. Die Tiere sind noch jung und haben meist keine Komorbiditäten, wie zum Beispiel Atherosklerose, arterielle Hypertonie, Diabetes Mellitus und Hypercholesterinämie. Diese, das Alter der Patienten ^[160], sowie die Einnahme von Medikamenten wie Statine, β -Blocker, etc. müssen alle als Confounder in Betracht gezogen werden, die einen Einfluss auf kardioprotektive Manöver besitzen ^[163].

Postkonditionierung konnte beim Menschen, sowie beim Hund effektiv nachgewiesen werden. Was Hunde von Schweinen unterscheidet, sind vor allem die koronaren Kollateralen. Während beim Hund gute Kollateralen ausgebildet sind, fehlen diese beim Schwein ^[177]. Auch zu bedenken ist, dass Patienten mit einer langwierigen koronaren Herzkrankheit höchstwahrscheinlich Kollateralen der Herzkranzarterien ausgebildet haben und deshalb auf Postkonditionierung anders reagieren, als Tiere ohne Kollateralen.

5.7. Interaktionen angewandter Pharmazeutika

Ciclosporin A hat ein bekanntes grosses Nebenwirkungsspektrum. Meist setzen diese Nebenwirkungen jedoch nur nach langer, chronischer Einnahme ein und sind im Kurzzeitversuch eher zu vernachlässigen.

Isofluran hat neben seiner Wirkung als Narkotikum auch einen kardioprotektiven Effekt im Rahmen der Postkonditionierung. Dieser wird durch eine Inhibition der mPTP während der Reperfusion über die Aktivierung des Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)-Pfades vermittelt, wie Chiari et al. am Kaninchen-Herzen untersuchen konnten [178, 179]. Wie groß dieser Effekt neben der bei uns angewandten Therapieformen ist, haben wir im Rahmen unserer Versuchsreihen nicht getestet. Eine eigene Wirkung von Isofluran auf den Reperfusionsschaden kann aber ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. In dem von Chiari et al. vorgestellten Modell mit Isofluran scheint die Kardioprotektive Wirkung zusammen mit IPoc sogar noch verstärkt. Um den Effekt von Isofluran in unserem Modell zu bestimmen, müsste in zukünftigen Experimenten, in Anlehnung an Karlsson et al. [129] eine Kontroll-Gruppe mit einem anderen Inhalations- oder i.v.- Narkotikum durchgeführt werden, sowie der Effekt der alleinigen Isofluran-Therapie untersucht werden. Weiterhin existieren Veröffentlichungen, die Isofluran zur Präkonditionierung eingesetzt haben [180]. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Isofluran im Rahmen der Präkonditionierung einen Effekt auf K-ATP-Kanäle hat, ähnlich dem von Adenosin.

Sowohl das Phänomen der Präkonditionierung, also auch der Postkonditionierung durch Isofluran wurde in unserem Modell nicht untersucht. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Isofluran einen Effekt auf die Infarktgröße und funktionelle Eigenschaften des Herzens hatte.

Propofol scheint auch einen kardioprotektiven Effekt bei Ischämie/Reperfusion auf das Herz zu haben [181]. Li et al. haben an Kardiomyozyten Hypoxie/Reperfusions-Versuche durchgeführt, die zeigten, dass die Zellviabilität besser und die Apoptoserate geringer nach Inkubation mit Propofol im Vergleich zur Kontrolle ist. Eine mögliche Beeinflussung der Infarktgröße kann daher ebenfalls nicht ausgeschlossen werden.

Sowohl Propofol als auch Isofluran wirken wahrscheinlich kardioprotektiv durch die Aktivierung von Signalkaskaden, wie sie auch durch die Ischämische

Postkonditionierung initiiert wird. Hierzu gehören vor allem PI3-AKT, ERK1/2, p70s6K und eNOS [178, 179, 181]. Da auch am Tag 2 die Anästhesie mittels Propofol und Isofluran durchgeführt wurde, kann ein Effekt durch die beiden Anästhetika auf die Signalkaskaden nicht ausgeschlossen werden. Zu erwarten wäre eine vermehrte Phosphorylierung von ERK 1/2 und GSK3 β . Die Ergebnisse der Western Blots lässt jedoch einen solchen Einfluss fragwürdig erscheinen. Zwar ist pERK1/2 in der Kontrollgruppe signifikant im Vergleich zu ERK 1/2 erhöht, jedoch trifft dies auf die IPoc-Gruppe nicht zu. Hier ist im Gegenteil pERK 1/2 signifikant geringer als ERK1/2.

In der hier vorgestellten Studie wurde Amiodaron, in Kochsalzlösung aufgelöst, als Antiarrhythmikum perioperativ verabreicht. In der Literatur wird Amiodaron ebenfalls ein kardioprotektiver Effekt zugesprochen. So scheint Amiodaron in niedrigen Konzentrationen ebenfalls die mPTP zu hemmen, sowie die Entstehung von ROS zu reduzieren [182, 183].

6. Zusammenfassung

Die moderne Therapie einer myokardialen Ischämie besteht in der raschen Wiederherstellung der Reperfusion. Durch die Reperfusion entstehen jedoch ebenfalls Myokardnekrosen, die den Infarkt vergrößern. Die dafür verantwortlichen Mechanismen sind weitgehend bekannt und können therapeutisch angegangen werden. Dies wird vor allem im Tierexperiment untersucht. Erste Studien sind bereits an Menschen durchgeführt worden. Zentrale Pathomechanismen sind eine Calcium-Überladung, pH-Änderung, Generierung von ROS und Akkumulation von Neutrophilen Granulozyten im Infarktgebiet. Im Mittelpunkt steht weiterhin die Öffnung der mPTP. Ischämische Postkonditionierung und CsA als direkter Inhibitor der mPTP sind in den meisten Fällen dazu im Stande, den Reperfusionsschaden zu minimieren.

Wir stellen hier ein I/R-Modell mit 60 min Total-Okklusion und 24h Reperfusion vor. Es wurde getestet, ob ein Postkonditionierungs-Algorithmus von 6x 20/20s und eine systemische und retrograde Infusion von 5mg/kg/KG Ciclosporin A den Reperfusionsschaden reduzieren können. Weiterhin wurde untersucht, ob IPoc einen Einfluss auf die Aktivierung des RISK-Pathways hat.

Sowohl IPoc als auch CsA systemisch oder retroinfundiert waren nicht in der Lage, den Infarkt oder die PMN-Akkumulation signifikant zu reduzieren. Jedoch sei erwähnt, dass CsA i.v. das grösste Potential zu haben scheint. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die regionale Funktion in der CsA i.v. Gruppe signifikant besser als die Funktion in der Retroinfusionsgruppe ist.

Dies lässt allgemein Zweifel an der Effektivität der bekannten Rettungsmechanismen und Pharmaka im Tiermodell am Schwein aufkommen. Andererseits kann man argumentieren, dass das unsrige Modell zu „hart“ war, der Postkonditionierungs-Algorithmus dafür zu schwach, sowie die Konzentration von CsA systemisch zu gering. Wir gehen davon aus, dass die Konzentration von CsA retroinfundiert zu hoch war und wahrscheinlich toxisch wirkte, sodass eine Abnahme der funktionellen Eigenschaften resultierte. Weiterhin ist anzunehmen, dass innerhalb von 24 h Reperfusion mehr Schäden akkumulieren und zur Infarktvergrößerung beitragen, als wie in anderen Modellen nach 2-3h Reperfusion zu detektieren sind.

Durch die Retroinfusion lässt sich eine signifikant höhere venöse und myokardiale Gewebekonzentration von Ciclosporin A erreichen. Gerade die myokardialen Konzentrationen waren noch am Tag 2 höher in der Retroinfusionsgruppe, als in der Gruppe der systemischen Applikation.

Eine signifikante generelle Aktivierung der RISK-Proteine durch IPoc fand nicht statt. Nur in der Kontrollgruppe konnte eine Aktivierung von ERK1/2 gezeigt werden. Dies spricht jedoch gegen eine Aktivierung von RISK im Schweinemodell durch IPoc. Gemessen am Tag 2 könnten diese Ergebnisse jedoch wertlos sein, da man die Aktivierung des RISK eher früh in der Reperfusion erwarten würde.

Da Unklarheiten hinsichtlich der anzuwendenden CsA Konzentration und des richtigen Postkonditionierungs - Algorithmus bestehen, wäre es sinnvoll weitere Experimente mit anderen Konzentrationen und Algorithmen durchzuführen. In diesem Zusammenhang müssen auch Proteine des RISK-Pathways weiter untersucht werden. Ausserdem muss der Einfluss von Propofol und anderen kardioprotektiven Pharmaka isoliert und neu betrachtet werden.

7. Abkürzungsverzeichnis

AAR	Area at risk
Abb.	Abbildung
AIV	anteriore interventrikuläre Vene
Akt	Aktin
atm	Atmosphären
CABG	coronary artery bypass graft
COX	Cyclooxygenase
CsA	Ciclosporin A
Da	Dalton
EDL	enddiastolische Länge
ESL	endsystolische Länge
F	French
FG	Fremdgewicht
g	Erdbeschleunigung
GSK3	Glykogen-Synthase-Kinase
HO-1	Häm-Oxygenase 1
iNOS	inducible Nitric Oxid Synthase
I/R	Ischämie / Reperfusion
IS	Ischämie
i.v.	intravenös
JAK	Januskinase
JR	Judkins rechts
JL	Judkins links
LAD	Left anterior descendent

LCA	Left coronary artery
M	Musculus
MAPK	Mitogen acitvated protein kinase
mg	miligramm
MHZ	Megahertz
min	Minute
Mn	Mangan
MPO	Myeloperoxidase
mPTP	mitochondrial permeability transition pore
NF-AT	nuclear factor of activated T-cells
NFkB	Nukleärer Faktor kB
n.s.	nicht signifikant
PI-3	Phosphatidyl-Inositol
PKC	Proteinkinase C
PMN	Polymorph Neutrophils.
RCX	ramus circumflexus
RISK	Reperfusion Injury Salvage Kinase
RIVA	Ramus interventricularis anterior
rpm	rotations per minute
SAFE	Survivor Activating Factor Enhancement
sek	Sekunde
SPECT	single photon emission computed tomography
STAT	Signal transducing and activator of transcription
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
UZ	Ultrazentrifuge
WBex	Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin

8. Literaturverzeichnis

1. Hamm, C.W., et al., *ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC)*. Eur Heart J, 2011. **32**(23): p. 2999-3054.
2. Hombach, V., W. Koenig, and M. Kochs, *[Acute heart infarct: epidemiology and pre-hospitalization phase]*. Internist (Berl), 2001. **42**(5): p. 649-50, 653-8.
3. Silber, S., *[Evidence-based management of ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI). Latest guidelines of the European Society of Cardiology (ESC) 2010]*. Herz, 2010. **35**(8): p. 558-64.
4. Grines, C., et al., *Primary coronary angioplasty compared with intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: six-month follow up and analysis of individual patient data from randomized trials*. Am Heart J, 2003. **145**(1): p. 47-57.
5. Keeley, E.C., J.A. Boura, and C.L. Grines, *Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials*. Lancet, 2003. **361**(9351): p. 13-20.
6. Ginks, W.R., et al., *Coronary artery reperfusion. II. Reduction of myocardial infarct size at 1 week after the coronary occlusion*. J Clin Invest, 1972. **51**(10): p. 2717-23.
7. Maroko, P.R., et al., *Coronary artery reperfusion. I. Early effects on local myocardial function and the extent of myocardial necrosis*. J Clin Invest, 1972. **51**(10): p. 2710-6.
8. Prasad, A., et al., *Reperfusion injury, microvascular dysfunction, and cardioprotection: the "dark side" of reperfusion*. Circulation, 2009. **120**(21): p. 2105-12.
9. Jennings, R.B., et al., *Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog*. Arch Pathol, 1960. **70**: p. 68-78.
10. Piper, H.M., D. Garcia-Dorado, and M. Ovize, *A fresh look at reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 1998. **38**(2): p. 291-300.
11. Park, J.L. and B.R. Lucchesi, *Mechanisms of myocardial reperfusion injury*. Ann Thorac Surg, 1999. **68**(5): p. 1905-12.

12. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, *Myocardial reperfusion injury*. N Engl J Med, 2007. **357**(11): p. 1121-35.
13. Hausenloy, D.J., S. Lecour, and D.M. Yellon, *Reperfusion injury salvage kinase and survivor activating factor enhancement prosurvival signaling pathways in ischemic postconditioning: two sides of the same coin*. Antioxid Redox Signal, 2011. **14**(5): p. 893-907.
14. Braunwald, E. and R.A. Kloner, *Myocardial reperfusion: a double-edged sword?* J Clin Invest, 1985. **76**(5): p. 1713-9.
15. Verma, S., et al., *Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist*. Circulation, 2002. **105**(20): p. 2332-6.
16. Kloner, R.A., C.E. Ganote, and R.B. Jennings, *The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog*. J Clin Invest, 1974. **54**(6): p. 1496-508.
17. Braunwald, E. and R.A. Kloner, *The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction*. Circulation, 1982. **66**(6): p. 1146-9.
18. Krug, A., R. Du Mesnil de, and G. Korb, *Blood supply of the myocardium after temporary coronary occlusion*. Circ Res, 1966. **19**(1): p. 57-62.
19. Manning, A.S. and D.J. Hearse, *Reperfusion-induced arrhythmias: mechanisms and prevention*. J Mol Cell Cardiol, 1984. **16**(6): p. 497-518.
20. Freude, B., et al., *Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion*. J Mol Cell Cardiol, 2000. **32**(2): p. 197-208.
21. Kloner, R.A., *Does reperfusion injury exist in humans?* J Am Coll Cardiol, 1993. **21**(2): p. 537-45.
22. Tsang, A., D.J. Hausenloy, and D.M. Yellon, *Myocardial postconditioning: reperfusion injury revisited*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **289**(1): p. H2-7.
23. Zhao, Z.Q., *Postconditioning in reperfusion injury: a status report*. Cardiovasc Drugs Ther, 2010. **24**(3): p. 265-79.
24. Vinten-Johansen, J., *Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 2004. **61**(3): p. 481-97.
25. Engler, R.L., et al., *Role of leukocytes in response to acute myocardial ischemia and reflow in dogs*. Am J Physiol, 1986. **251**(2 Pt 2): p. H314-23.

26. Hearse, D.J., S.M. Humphrey, and E.B. Chain, *Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release*. J Mol Cell Cardiol, 1973. **5**(4): p. 395-407.
27. Ovize, M., et al., *Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology*. Cardiovasc Res, 2010. **87**(3): p. 406-23.
28. Chambers, D.E., et al., *Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia*. J Mol Cell Cardiol, 1985. **17**(2): p. 145-52.
29. Akizuki, S., et al., *Infarct size limitation by the xanthine oxidase inhibitor, allopurinol, in closed-chest dogs with small infarcts*. Cardiovasc Res, 1985. **19**(11): p. 686-92.
30. Kilgore, K.S. and B.R. Lucchesi, *Reperfusion injury after myocardial infarction: the role of free radicals and the inflammatory response*. Clin Biochem, 1993. **26**(5): p. 359-70.
31. Gaboury, J.P., D.C. Anderson, and P. Kubes, *Molecular mechanisms involved in superoxide-induced leukocyte-endothelial cell interactions in vivo*. Am J Physiol, 1994. **266**(2 Pt 2): p. H637-42.
32. Akgur, F.M., et al., *Role of superoxide in hemorrhagic shock-induced P-selectin expression*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **279**(2): p. H791-7.
33. Patel, K.D., et al., *Oxygen radicals induce human endothelial cells to express GMP-140 and bind neutrophils*. J Cell Biol, 1991. **112**(4): p. 749-59.
34. Zweier, J.L. and M.A. Talukder, *The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 2006. **70**(2): p. 181-90.
35. JL, P. and L. BR, - *Mechanisms of myocardial reperfusion injury*. - Ann Thorac Surg. 1999 Nov;68(5):1905-12., (- 0003-4975 (Print)): p. T - ppublish.
36. Kako, K.J., *Free radical effects on membrane protein in myocardial ischemia/reperfusion injury*. J Mol Cell Cardiol, 1987. **19**(2): p. 209-11.
37. Guarnieri, C., F. Flamigni, and C.M. Caldarera, *Role of oxygen in the cellular damage induced by re-oxygenation of hypoxic heart*. J Mol Cell Cardiol, 1980. **12**(8): p. 797-808.
38. Zima, A.V. and L.A. Blatter, *Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters*. Cardiovasc Res, 2006. **71**(2): p. 310-21.

39. Schafer, C., et al., *Role of the reverse mode of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury*. Cardiovasc Res, 2001. **51**(2): p. 241-50.
40. Crompton, M. and A. Costi, *Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca²⁺, inorganic phosphate and oxidative stress. A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular Ca²⁺ overload*. Eur J Biochem, 1988. **178**(2): p. 489-501.
41. Tanveer, A., et al., *Involvement of cyclophilin D in the activation of a mitochondrial pore by Ca²⁺ and oxidant stress*. Eur J Biochem, 1996. **238**(1): p. 166-72.
42. Halestrap, A.P., *Calcium-dependent opening of a non-specific pore in the mitochondrial inner membrane is inhibited at pH values below 7. Implications for the protective effect of low pH against chemical and hypoxic cell damage*. Biochem J, 1991. **278 (Pt 3)**: p. 715-9.
43. Di Lisa, F. and P. Bernardi, *A CaPful of mechanisms regulating the mitochondrial permeability transition*. J Mol Cell Cardiol, 2009. **46**(6): p. 775-80.
44. Piper, H.M., et al., *The role of Na⁺/H⁺ exchange in ischemia-reperfusion*. Basic Res Cardiol, 1996. **91**(3): p. 191-202.
45. Garcia-Dorado, D. and J. Oliveras, *Myocardial oedema: a preventable cause of reperfusion injury?* Cardiovasc Res, 1993. **27**(9): p. 1555-63.
46. Ruiz-Meana, M., et al., *Effect of osmotic stress on sarcolemmal integrity of isolated cardiomyocytes following transient metabolic inhibition*. Cardiovasc Res, 1995. **30**(1): p. 64-9.
47. Yuan, Y., et al., *Interaction of neutrophils and endothelium in isolated coronary venules and arterioles*. Am J Physiol, 1995. **268**(1 Pt 2): p. H490-8.
48. Vakeva, A.P., et al., *Myocardial infarction and apoptosis after myocardial ischemia and reperfusion: role of the terminal complement components and inhibition by anti-C5 therapy*. Circulation, 1998. **97**(22): p. 2259-67.
49. Jordan, J.E., Z.Q. Zhao, and J. Vinten-Johansen, *The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 1999. **43**(4): p. 860-78.

50. Siminiak, T., N.A. Flores, and D.J. Sheridan, *Neutrophil interactions with endothelium and platelets: possible role in the development of cardiovascular injury*. Eur Heart J, 1995. **16**(2): p. 160-70.
51. Schmid-Schonbein, G.W., *The damaging potential of leukocyte activation in the microcirculation*. Angiology, 1993. **44**(1): p. 45-56.
52. Ma, X.L., et al., *Neutrophil-mediated vasoconstriction and endothelial dysfunction in low-flow perfusion-reperfused cat coronary artery*. Circ Res, 1991. **69**(1): p. 95-106.
53. Zhao, Z.Q., et al., *Dynamic progression of contractile and endothelial dysfunction and infarct extension in the late phase of reperfusion*. J Surg Res, 2000. **94**(2): p. 133-44.
54. Halestrap, A.P., *What is the mitochondrial permeability transition pore?* J Mol Cell Cardiol, 2009. **46**(6): p. 821-31.
55. Basso, E., et al., *Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D*. J Biol Chem, 2005. **280**(19): p. 18558-61.
56. Griffiths, E.J. and A.P. Halestrap, *Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion*. Biochem J, 1995. **307 (Pt 1)**: p. 93-8.
57. Kim, J.S., Y. Jin, and J.J. Lemasters, *Reactive oxygen species, but not Ca²⁺ overloading, trigger pH- and mitochondrial permeability transition-dependent death of adult rat myocytes after ischemia-reperfusion*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(5): p. H2024-34.
58. Nicolli, A., V. Petronilli, and P. Bernardi, *Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by matrix pH. Evidence that the pore open-closed probability is regulated by reversible histidine protonation*. Biochemistry, 1993. **32**(16): p. 4461-5.
59. Zorov, D.B., et al., *Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes*. J Exp Med, 2000. **192**(7): p. 1001-14.
60. Petronilli, V., et al., *The mitochondrial permeability transition, release of cytochrome c and cell death. Correlation with the duration of pore openings in situ*. J Biol Chem, 2001. **276**(15): p. 12030-4.

61. Haworth, R.A. and D.R. Hunter, *The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site*. Arch Biochem Biophys, 1979. **195**(2): p. 460-7.
62. Szabo, I., P. Bernardi, and M. Zoratti, *Modulation of the mitochondrial megachannel by divalent cations and protons*. J Biol Chem, 1992. **267**(5): p. 2940-6.
63. Javadov, S.A., et al., *Ischaemic preconditioning inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores in the reperfused rat heart*. J Physiol, 2003. **549**(Pt 2): p. 513-24.
64. Piot, C., et al., *Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction*. N Engl J Med, 2008. **359**(5): p. 473-81.
65. Argaud, L., et al., *Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition*. Circulation, 2005. **111**(2): p. 194-7.
66. Murry, C.E., R.B. Jennings, and K.A. Reimer, *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium*. Circulation, 1986. **74**(5): p. 1124-36.
67. Zhao, Z.Q., et al., *Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **285**(2): p. H579-88.
68. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *Preconditioning and postconditioning: underlying mechanisms and clinical application*. Atherosclerosis, 2009. **204**(2): p. 334-41.
69. Eisen, A., et al., *Ischemic preconditioning: nearly two decades of research. A comprehensive review*. Atherosclerosis, 2004. **172**(2): p. 201-10.
70. Yellon, D.M., A.M. Alkhulaifi, and W.B. Pugsley, *Preconditioning the human myocardium*. Lancet, 1993. **342**(8866): p. 276-7.
71. Tang, X.L., et al., *Time course of late preconditioning against myocardial stunning in conscious pigs*. Circ Res, 1996. **79**(3): p. 424-34.
72. Schulz, R., et al., *Ischemic preconditioning in pigs: a graded phenomenon: its relation to adenosine and bradykinin*. Circulation, 1998. **98**(10): p. 1022-9.
73. Kuzuya, T., et al., *Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia*. Circ Res, 1993. **72**(6): p. 1293-9.

74. Marber, M.S., et al., *Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction*. Circulation, 1993. **88**(3): p. 1264-72.
75. Holmuhamedov, E.L., L. Wang, and A. Terzic, *ATP-sensitive K⁺ channel openers prevent Ca²⁺ overload in rat cardiac mitochondria*. J Physiol, 1999. **519 Pt 2**: p. 347-60.
76. Hausenloy, D.J., et al., *Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning?* Cardiovasc Res, 2002. **55**(3): p. 534-43.
77. Javadov, S.A., et al., *Protection of hearts from reperfusion injury by propofol is associated with inhibition of the mitochondrial permeability transition*. Cardiovasc Res, 2000. **45**(2): p. 360-9.
78. Bolli, R., *The late phase of preconditioning*. Circ Res, 2000. **87**(11): p. 972-83.
79. Stein, A.B., et al., *Delayed adaptation of the heart to stress: late preconditioning*. Stroke, 2004. **35**(11 Suppl 1): p. 2676-9.
80. Sato, H., et al., *Gradual reperfusion reduces infarct size and endothelial injury but augments neutrophil accumulation*. Ann Thorac Surg, 1997. **64**(4): p. 1099-107.
81. Halkos, M.E., et al., *Myocardial protection with postconditioning is not enhanced by ischemic preconditioning*. Ann Thorac Surg, 2004. **78**(3): p. 961-9; discussion 969.
82. Staat, P., et al., *Postconditioning the human heart*. Circulation, 2005. **112**(14): p. 2143-8.
83. Zhao, Z.Q. and J. Vinten-Johansen, *Postconditioning: reduction of reperfusion-induced injury*. Cardiovasc Res, 2006. **70**(2): p. 200-11.
84. Yang, X.M., et al., *Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways*. J Am Coll Cardiol, 2004. **44**(5): p. 1103-10.
85. Kin, H., et al., *Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion*. Cardiovasc Res, 2004. **62**(1): p. 74-85.
86. Schipke, J.D., et al., *[Postconditioning: a brief review]*. Herz, 2006. **31**(6): p. 600-6.

87. Skyschally, A., et al., *Ischemic postconditioning: experimental models and protocol algorithms*. Basic Res Cardiol, 2009. **104**(5): p. 469-83.
88. Iliodromitis, E.K., et al., *Protection from post-conditioning depends on the number of short ischemic insults in anesthetized pigs*. Basic Res Cardiol, 2006. **101**(6): p. 502-7.
89. Manintveld, O.C., et al., *Cardiac effects of postconditioning depend critically on the duration of index ischemia*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **292**(3): p. H1551-60.
90. Tsang, A., et al., *Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway*. Circ Res, 2004. **95**(3): p. 230-2.
91. Cohen, M.V., X.M. Yang, and J.M. Downey, *The pH hypothesis of postconditioning: staccato reperfusion reintroduces oxygen and perpetuates myocardial acidosis*. Circulation, 2007. **115**(14): p. 1895-903.
92. Cohen, M.V., X.M. Yang, and J.M. Downey, *Acidosis, oxygen, and interference with mitochondrial permeability transition pore formation in the early minutes of reperfusion are critical to postconditioning's success*. Basic Res Cardiol, 2008. **103**(5): p. 464-71.
93. Heusch, G., *Postconditioning: old wine in a new bottle?* J Am Coll Cardiol, 2004. **44**(5): p. 1111-2.
94. Hori, M., et al., *Staged reperfusion attenuates myocardial stunning in dogs. Role of transient acidosis during early reperfusion*. Circulation, 1991. **84**(5): p. 2135-45.
95. Kin, H., et al., *Inhibition of myocardial apoptosis by postconditioning is associated with attenuation of oxidative stress-mediated nuclear factor-kappa B translocation and TNF alpha release*. Shock, 2008. **29**(6): p. 761-8.
96. Sun, H.Y., et al., *Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca²⁺ overload*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **288**(4): p. H1900-8.
97. Inserte, J., et al., *Contribution of delayed intracellular pH recovery to ischemic postconditioning protection*. Antioxid Redox Signal, 2011. **14**(5): p. 923-39.
98. Inserte, J., et al., *Calpain-mediated impairment of Na⁺/K⁺-ATPase activity during early reperfusion contributes to cell death after myocardial ischemia*. Circ Res, 2005. **97**(5): p. 465-73.

99. Schwartz, L.M. and C.J. Lagranha, *Ischemic postconditioning during reperfusion activates Akt and ERK without protecting against lethal myocardial ischemia-reperfusion injury in pigs*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(3): p. H1011-8.
100. Sivaraman, V., et al., *Postconditioning protects human atrial muscle through the activation of the RISK pathway*. Basic Res Cardiol, 2007. **102**(5): p. 453-9.
101. Boengler, K., et al., *The myocardial JAK/STAT pathway: from protection to failure*. Pharmacol Ther, 2008. **120**(2): p. 172-85.
102. Lecour, S., *Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway?* J Mol Cell Cardiol, 2009. **47**(1): p. 32-40.
103. Lacerda, L., et al., *Ischaemic postconditioning protects against reperfusion injury via the SAFE pathway*. Cardiovasc Res, 2009. **84**(2): p. 201-8.
104. Heusch, G., et al., *Mitochondrial STAT3 Activation and Cardioprotection by Ischemic Postconditioning in Pigs With Regional Myocardial Ischemia/Reperfusion*. Circ Res, 2011. **109**(11): p. 1302-8.
105. Cohen, M.V. and J.M. Downey, *Adenosine: trigger and mediator of cardioprotection*. Basic Res Cardiol, 2008. **103**(3): p. 203-15.
106. Kin, H., et al., *Postconditioning reduces infarct size via adenosine receptor activation by endogenous adenosine*. Cardiovasc Res, 2005. **67**(1): p. 124-33.
107. Gross, E.R. and G.J. Gross, *Ligand triggers of classical preconditioning and postconditioning*. Cardiovasc Res, 2006. **70**(2): p. 212-21.
108. Zatta, A.J., et al., *Evidence that cardioprotection by postconditioning involves preservation of myocardial opioid content and selective opioid receptor activation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **294**(3): p. H1444-51.
109. Gomez, L., et al., *Inhibition of GSK3beta by postconditioning is required to prevent opening of the mitochondrial permeability transition pore during reperfusion*. Circulation, 2008. **117**(21): p. 2761-8.
110. Juhaszova, M., et al., *Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore*. J Clin Invest, 2004. **113**(11): p. 1535-49.
111. Schulman, D., D.S. Latchman, and D.M. Yellon, *Urocortin protects the heart from reperfusion injury via upregulation of p42/p44 MAPK signaling pathway*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **283**(4): p. H1481-8.

112. Skyschally, A., et al., *Ischemic postconditioning in pigs: no causal role for RISK activation*. Circ Res, 2009. **104**(1): p. 15-8.
113. Musiolik, J., et al., *Reduction of infarct size by gentle reperfusion without activation of reperfusion injury salvage kinases in pigs*. Cardiovasc Res, 2010. **85**(1): p. 110-7.
114. Boengler, K., et al., *Cardioprotection by ischemic postconditioning is lost in aged and STAT3-deficient mice*. Circ Res, 2008. **102**(1): p. 131-5.
115. Tamarelle, S., et al., *RISK and SAFE signaling pathway interactions in remote limb ischemic preconditioning in combination with local ischemic postconditioning*. Basic Res Cardiol, 2011. **106**(6): p. 1329-39.
116. Suleman, N., et al., *Dual activation of STAT-3 and Akt is required during the trigger phase of ischaemic preconditioning*. Cardiovasc Res, 2008. **79**(1): p. 127-33.
117. Nguyen, M.H., et al., *TEL-JAK2 mediates constitutive activation of the phosphatidylinositol 3'-kinase/protein kinase B signaling pathway*. J Biol Chem, 2001. **276**(35): p. 32704-13.
118. Heusch, G., K. Boengler, and R. Schulz, *Cardioprotection: nitric oxide, protein kinases, and mitochondria*. Circulation, 2008. **118**(19): p. 1915-9.
119. Mykytenko, J., et al., *Persistent beneficial effect of postconditioning against infarct size: role of mitochondrial K(ATP) channels during reperfusion*. Basic Res Cardiol, 2008. **103**(5): p. 472-84.
120. Costa, A.D., et al., *The mechanism by which the mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel opening and H₂O₂ inhibit the mitochondrial permeability transition*. J Biol Chem, 2006. **281**(30): p. 20801-8.
121. Heusler, K. and A. Pletscher, *The controversial early history of cyclosporin*. Swiss Med Wkly, 2001. **131**(21-22): p. 299-302.
122. Liu, J., et al., *Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes*. Cell, 1991. **66**(4): p. 807-15.
123. Jung, K. and M. Pergande, *Influence of cyclosporin A on the respiration of isolated rat kidney mitochondria*. FEBS Lett, 1985. **183**(1): p. 167-9.
124. Fournier, N., G. Ducet, and A. Crevat, *Action of cyclosporine on mitochondrial calcium fluxes*. J Bioenerg Biomembr, 1987. **19**(3): p. 297-303.

125. Crompton, M., H. Ellinger, and A. Costi, *Inhibition by cyclosporin A of a Ca²⁺-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress*. Biochem J, 1988. **255**(1): p. 357-60.
126. Nakagawa, T., et al., *Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death*. Nature, 2005. **434**(7033): p. 652-8.
127. Nazareth, W., N. Yafei, and M. Crompton, *Inhibition of anoxia-induced injury in heart myocytes by cyclosporin A*. J Mol Cell Cardiol, 1991. **23**(12): p. 1351-4.
128. Skyschally, A., R. Schulz, and G. Heusch, *Cyclosporine A at reperfusion reduces infarct size in pigs*. Cardiovasc Drugs Ther, 2010. **24**(1): p. 85-7.
129. Karlsson, L.O., et al., *Cyclosporine does not reduce myocardial infarct size in a porcine ischemia-reperfusion model*. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2010. **15**(2): p. 182-9.
130. Karlsson, L.O., N. Bergh, and L. Grip, *Cyclosporine A, 2.5 mg/kg, Does Not Reduce Myocardial Infarct Size in a Porcine Model of Ischemia and Reperfusion*. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2011.
131. Lim, W.Y., C.M. Messow, and C. Berry, *Cyclosporin variably and inconsistently reduces infarct size in experimental models of reperfused myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis*. Br J Pharmacol, 2012. **165**(7): p. 2034-43.
132. Laskey, W.K., *Brief repetitive balloon occlusions enhance reperfusion during percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: a pilot study*. Catheter Cardiovasc Interv, 2005. **65**(3): p. 361-7.
133. Ma, X.J., et al., *Effect of postconditioning on coronary blood flow velocity and endothelial function in patients with acute myocardial infarction*. Scand Cardiovasc J, 2006. **40**(6): p. 327-33.
134. Yang, X.C., et al., *Reduction in myocardial infarct size by postconditioning in patients after percutaneous coronary intervention*. J Invasive Cardiol, 2007. **19**(10): p. 424-30.
135. Thibault, H., et al., *Long-term benefit of postconditioning*. Circulation, 2008. **117**(8): p. 1037-44.
136. Laskey, W.K., et al., *Concordant improvements in coronary flow reserve and ST-segment resolution during percutaneous coronary intervention for acute*

- myocardial infarction: a benefit of postconditioning*. Catheter Cardiovasc Interv, 2008. **72**(2): p. 212-20.
137. Zhao, W.S., et al., *A 60-s postconditioning protocol by percutaneous coronary intervention inhibits myocardial apoptosis in patients with acute myocardial infarction*. Apoptosis, 2009. **14**(10): p. 1204-11.
 138. Freixa, X., et al., *Ischaemic postconditioning revisited: lack of effects on infarct size following primary percutaneous coronary intervention*. Eur Heart J, 2012. **33**(1): p. 103-12.
 139. Ma, X., et al., *Effect of postconditioning on coronary blood flow velocity and endothelial function and LV recovery after myocardial infarction*. J Interv Cardiol, 2006. **19**(5): p. 367-75.
 140. Xue, F., et al., *Postconditioning the human heart in percutaneous coronary intervention*. Clin Cardiol, 2010. **33**(7): p. 439-44.
 141. WS, Z., et al., - *A 60-s postconditioning protocol by percutaneous coronary intervention inhibits*. - Apoptosis. 2009 Oct;14(10):1204-11., (- 1573-675X (Electronic)): p. T - ppublish.
 142. Mewton, N., et al., *Effect of cyclosporine on left ventricular remodeling after reperfused myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2010. **55**(12): p. 1200-5.
 143. Kupatt, C., et al., *Selective retroinfusion of GSH and cariporide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in a preclinical pig model*. Cardiovasc Res, 2004. **61**(3): p. 530-7.
 144. Boekstegers, P., et al., *Preservation of regional myocardial function and myocardial oxygen tension during acute ischemia in pigs: comparison of selective synchronized suction and retroinfusion of coronary veins to synchronized coronary venous retroperfusion*. J Am Coll Cardiol, 1994. **23**(2): p. 459-69.
 145. Boekstegers, P., et al., *Stent-based approach for ventricle-to-coronary artery bypass*. Circulation, 2002. **106**(8): p. 1000-6.
 146. Boekstegers, P., et al., *Selective suction and pressure-regulated retroinfusion: an effective and safe approach to retrograde protection against myocardial ischemia in patients undergoing normal and high risk percutaneous transluminal coronary angioplasty*. J Am Coll Cardiol, 1998. **31**(7): p. 1525-33.
 147. Boekstegers, P. and C. Kupatt, *Current concepts and applications of coronary venous retroinfusion*. Basic Res Cardiol, 2004. **99**(6): p. 373-81.

148. Boekstegers, P., *Perspectives on selective retroinfusion of coronary veins as an alternative approach for myocardial gene transfer and angiogenesis*. J Invasive Cardiol, 2001. **13**(4): p. 339-42.
149. Boekstegers, P., et al., *Myocardial gene transfer by selective pressure-regulated retroinfusion of coronary veins*. Gene Ther, 2000. **7**(3): p. 232-40.
150. Boekstegers, P., et al., *Selective pressure-regulated retroinfusion of coronary veins as an alternative access of ischemic myocardium: implications for myocardial protection, myocardial gene transfer and angiogenesis*. Z Kardiol, 2000. **89 Suppl 9**: p. IX/109-12.
151. von Degenfeld, G., et al., *Selective pressure-regulated retroinfusion of fibroblast growth factor-2 into the coronary vein enhances regional myocardial blood flow and function in pigs with chronic myocardial ischemia*. J Am Coll Cardiol, 2003. **42**(6): p. 1120-8.
152. von Degenfeld, G., W. Giehl, and P. Boekstegers, *Targeting of dobutamine to ischemic myocardium without systemic effects by selective suction and pressure-regulated retroinfusion*. Cardiovasc Res, 1997. **35**(2): p. 233-40.
153. Kupatt, C., et al., *Retroinfusion of NFkappaB decoy oligonucleotide extends cardioprotection achieved by CD18 inhibition in a preclinical study of myocardial ischemia and retroinfusion in pigs*. Gene Ther, 2002. **9**(8): p. 518-26.
154. Raake, P., et al., *Myocardial gene transfer by selective pressure-regulated retroinfusion of coronary veins: comparison with surgical and percutaneous intramyocardial gene delivery*. J Am Coll Cardiol, 2004. **44**(5): p. 1124-9.
155. Kupatt, C., et al., *Endothelial nitric oxide synthase overexpression provides a functionally relevant angiogenic switch in hibernating pig myocardium*. J Am Coll Cardiol, 2007. **49**(14): p. 1575-84.
156. Kupatt, C., et al., *Retroinfusion of embryonic endothelial progenitor cells attenuates ischemia-reperfusion injury in pigs: role of phosphatidylinositol 3-kinase/AKT kinase*. Circulation, 2005. **112**(9 Suppl): p. I117-22.
157. Harada, K., et al., *Vascular endothelial growth factor administration in chronic myocardial ischemia*. Am J Physiol, 1996. **270**(5 Pt 2): p. H1791-802.
158. Bugge-Asperheim, B., S. Leraand, and F. Kiil, *Local dimensional changes of the myocardium measured by ultrasonic technique*. Scand J Clin Lab Invest, 1969. **24**(4): p. 361-71.

159. Ilebekk, A. and J. Lekven, *Cardiac effects of nicotine in dogs*. Scand J Clin Lab Invest, 1974. **33**(2): p. 153-9.
160. Boengler, K., R. Schulz, and G. Heusch, *Loss of cardioprotection with ageing*. Cardiovasc Res, 2009. **83**(2): p. 247-61.
161. Vogeser, M. and C. Seger, *A decade of HPLC-MS/MS in the routine clinical laboratory--goals for further developments*. Clin Biochem, 2008. **41**(9): p. 649-62.
162. Przyklenk, K., et al., *Cardioprotection with postconditioning: loss of efficacy in murine models of type-2 and type-1 diabetes*. Antioxid Redox Signal, 2011. **14**(5): p. 781-90.
163. Heusch, G., *Reduction of infarct size by ischaemic post-conditioning in humans: fact or fiction?* Eur Heart J, 2012. **33**(1): p. 13-5.
164. Liu, L., et al., *Age-associated differences in the inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening by cyclosporine A*. Acta Anaesthesiol Scand, 2011. **55**(5): p. 622-30.
165. Dreyer, W.J., et al., *Neutrophil accumulation in ischemic canine myocardium. Insights into time course, distribution, and mechanism of localization during early reperfusion*. Circulation, 1991. **84**(1): p. 400-11.
166. Griffiths, E.J. and A.P. Halestrap, *Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts*. J Mol Cell Cardiol, 1993. **25**(12): p. 1461-9.
167. D'Angelo, G., et al., *Cyclosporin A prevents the hypoxic adaptation by activating hypoxia-inducible factor-1alpha Pro-564 hydroxylation*. J Biol Chem, 2003. **278**(17): p. 15406-11.
168. Muslin, A.J., *A salutary role for calcineurin in the heart*. J Mol Cell Cardiol, 2010. **48**(6): p. 1039-40.
169. Doyle, V., S. Virji, and M. Crompton, *Evidence that cyclophilin-A protects cells against oxidative stress*. Biochem J, 1999. **341** (Pt 1): p. 127-32.
170. Heusch, G., A. Skyschally, and R. Schulz, *The in-situ pig heart with regional ischemia/reperfusion - ready for translation*. J Mol Cell Cardiol, 2011. **50**(6): p. 951-63.
171. Stubhan, M., et al., *Evaluation of cardiovascular and ECG parameters in the normal, freely moving Gottingen Minipig*. J Pharmacol Toxicol Methods, 2008. **57**(3): p. 202-11.

172. Behrends, M., et al., *Inconsistent relation of MAPK activation to infarct size reduction by ischemic preconditioning in pigs*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **279**(3): p. H1111-9.
173. Ovize, M., et al., *Preconditioning reduces infarct size but accelerates time to ventricular fibrillation in ischemic pig heart*. Am J Physiol, 1995. **269**(1 Pt 2): p. H72-9.
174. Zhao, J.L., et al., *Different effects of postconditioning on myocardial no-reflow in the normal and hypercholesterolemic mini-swines*. Microvasc Res, 2007. **73**(2): p. 137-42.
175. Andreka, G., et al., *Remote ischaemic postconditioning protects the heart during acute myocardial infarction in pigs*. Heart, 2007. **93**(6): p. 749-52.
176. Sheu, J.J., et al., *Intra-coronary administration of cyclosporine limits infarct size, attenuates remodeling and preserves left ventricular function in porcine acute anterior infarction*. Int J Cardiol, 2011. **147**(1): p. 79-87.
177. Maxwell, M.P., D.J. Hearse, and D.M. Yellon, *Species variation in the coronary collateral circulation during regional myocardial ischaemia: a critical determinant of the rate of evolution and extent of myocardial infarction*. Cardiovasc Res, 1987. **21**(10): p. 737-46.
178. Chiari, P.C., et al., *Isoflurane protects against myocardial infarction during early reperfusion by activation of phosphatidylinositol-3-kinase signal transduction: evidence for anesthetic-induced postconditioning in rabbits*. Anesthesiology, 2005. **102**(1): p. 102-9.
179. Krolkowski, J.G., et al., *Role of Erk1/2, p70s6K, and eNOS in isoflurane-induced cardioprotection during early reperfusion in vivo*. Can J Anaesth, 2006. **53**(2): p. 174-82.
180. Kersten, J.R., et al., *Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K(ATP) channels: reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase*. Anesthesiology, 1997. **87**(2): p. 361-70.
181. Li, H., et al., *Propofol post-conditioning protects against cardiomyocyte apoptosis in hypoxia/reoxygenation injury by suppressing nuclear factor-kappa B translocation via extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathway*. Eur J Anaesthesiol, 2011. **28**(7): p. 525-34.
182. Varbiro, G., et al., *Protective effect of amiodarone but not N-desethylamiodarone on postischemic hearts through the inhibition of*

- mitochondrial permeability transition*. J Pharmacol Exp Ther, 2003. **307**(2): p. 615-25.
183. Varbiro, G., et al., *Concentration dependent mitochondrial effect of amiodarone*. Biochem Pharmacol, 2003. **65**(7): p. 1115-28.
184. Inserte, J., et al., *Delayed recovery of intracellular acidosis during reperfusion prevents calpain activation and determines protection in postconditioned myocardium*. Cardiovasc Res, 2009. **81**(1): p. 116-22.

9. Danksagung

Besonders danken möchte ich Herrn Prof. Boekstegers für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, seine Unterstützung und seinen Vorschlag für die Gewährung eines Stipendiums im Rahmen der Rudolf- und Brigitte Zenner-Stiftung. Diese Stiftung unterstützt Doktoranden des Universitätsklinikums Großhadern bei Ihren Forschungsvorhaben. Ihnen sei ebenfalls herzlich für die Unterstützung gedankt.

Herzlich danken möchte ich meinen Betreuern PD Dr. Corinna Lebherz, Dr. Michael Thormann und Dr. Rabea Hinkel, die mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite standen und mich in meiner Arbeit unterstützt haben. Sie haben mich in die hochinteressante großtierexperimentelle Arbeits- und Denkweise eingeführt und standen mir immer zur Seite.

Des weiteren möchte ich den Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe für die freundschaftliche, wissenschaftliche und technische Unterstützung danken. Hier seien besonders Christine Rothe, Susanne Helbig und Frau Dr. Chiraz El-Aouni zu erwähnen.

Herrn Prof. Pohl, Leiter des WBEx möchte ich für die Überlassung der Räumlichkeiten im Institut für chirurgische Forschung danken.

Ausserdem sei der großtierexperimentellen Forschungsgruppe der Herzchirurgie des Klinikums Grosshadern gedankt, mit denen wir unsere Räumlichkeiten teilten und hiermit vor allem für die freundliche Zusammenarbeit und gegenseitige Hilfe.

Ausserdem möchte ich all meinen Freunden danken, die mich während der Fertigstellung meiner Doktorarbeit mit Rat und Tat unterstützt haben.

Der letzte aber entscheidende Dank gilt im Besonderen meinen Eltern, die mich in großzügiger, familiär selbstverständlicher Weise unterstützt und immer an mich geglaubt haben. Ihnen und meiner ganzen Familie ist diese Arbeit gewidmet.